

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Caractérisation moléculaire, localisation cellulaire et
conservation des protéines impliquées dans le processus
d'invasion des érythrocytes par *Babesia divergens*

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie
Spécialité : Parasitologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Yi SUN

Le 27 janvier 2011, devant le jury ci-dessous

Président
Rapporteurs Bernard Carcy, Maître de conférences, Université de Montpellier 2
Marie-Pierre Ryser-Degiorgis, Maître de conférences, Université de Bern
Examineurs Jean-François Dubremetz, Directeur de recherche, CNRS - Université de Montpellier 2
Patrice Le Pape, Professeur, Université de Nantes
Alain Chauvin, Professeur, Oniris Nantes

Directeur de thèse : Alain CHAUVIN
Coencadrants : Laurence Malandrin
Emmanuelle Moreau

ED :
(Uniquement pour STIM et SPIGA)

Remerciements

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à M. Carcy et Mme. Ryser-Degiorgis d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Merci à M. Dubremetz d'avoir bien voulu participer au jury de cette thèse. Je le remercie également pour son aide en microscopie électronique et pour tous ses conseils qu'il m'a prodigués pendant ma thèse

Merci également à M. Le Pape , pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à mon directeur de thèse Alain Chauvin, responsable de l'équipe « Interactions Tique-Pathogène-Hôte» de l'UMR INRA/ONIRIS 1300 « Bioagression, Epidémiologie et Analyse de risque », de m'avoir accueillie au sein de son équipe, et qui m'a permis d'effectuer cette thèse dans de très bonnes et très agréables conditions de travail.

Merci à Laurence Malandrin et Emmanuelle Moreau, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse et dont l'aide précieuse m'a été indispensable sur le plan scientifique. Je tiens également à les remercier pour l'aide qu'elles m'ont apporté pour faciliter ma vie familiale. Merci pour la confiance et la sympathie qu'elles m'ont témoignées au cours de ces trois années de thèse.

Merci à la région Pays de la Loire pour la bourse qui a permis de financer mes travaux en France.

Merci également aux membres du comité de thèse, Jean-Christophe Barale, Fabien Brossier, Laurent Marché, pour les discussions intéressantes et enrichissantes et les conseils qui ont permis d'améliorer mon travail de thèse.

Ma profonde gratitude et mes sincères remerciements vont à Laurence Dubreil, pour l'aide en microscopie confocale, à Olivier Plantard, pour l'aide en analyse phylogénétique, à Laurence Berry, pour l'aide permettant l'observation de la vacuole parasitophore, à Hélène Rogniaux, pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse, et surtout pour leur patience de tout instant afin de résoudre les problèmes techniques et pour les discussions.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe et plus particulièrement Sylvie Martin et Juliette Bordo pour leur gentillesse et leur efficacité lors des difficultés administratives ou logistiques que j'ai rencontrées.

Je tiens enfin à remercier les collègues, les amis, qui m'ont aidés au cours des trois ans de cette thèse : Albert Agoulon, Jean-Michel Allard, Françoise Armand, Suzanne Bastian, Agnès Bouju, Anaëlle Bourigault, Nadine Brisseau, Nathalie Delacotte, Jean-Pierre Delattre, Marie-Astride Dumont, Axelle Hermouet, Maggy Jouglin, Nelly Le Martret, Monique L'Hostis, Olivier Plantard et Patrice Roy.

Mes remerciements vont également à mes collègues doctorants Claire, Rim, Anne-Frieda, Simon, Aurélie, Clara, Priscilla, Ouafae, Charlène, Edouard, Maud, Apolline, Anne, Marie-lucile, Nolwenn, pour les discussions profitables et leur aide aimable.

Je tiens à remercier mon amie Chantal Boulard, directeur de recherches au laboratoire d'Immunopathologie des maladies parasitaires de l'INRA de Tours, pour sa gentillesse et toutes les aides qu'elle m'a apportées durant mes séjours en France.

Finalement j'adresse un grand merci à toute ma famille en particulier à mes parents et à mon mari pour leur soutien moral durant les moments difficiles que j'ai traversés, et à ma puce Zoé, la joie de ma vie.

SOMMAIRE

Remerciements	1
Sommaire	3
Liste des figures	5
Liste des tableaux	7
Liste des annexes	9
Liste des abréviations	11
Introduction et objectifs	13
Synthèse bibliographique	19
I. <i>Babesia divergens</i>	21
A). La babésiose bovine à <i>B. divergens</i>	21
B). Biologie de <i>B. divergens</i>	25
C). <i>B. divergens</i> et les autres apicomplexa	30
II. Processus d'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes	35
A). Le mérozoïte : forme parasitaire infectant l'érythrocyte	35
B). Interaction mérozoïte – érythrocyte	38
III. Description moléculaire et fonctionnelle des protéines impliquées dans le processus d'invasion	45
A). Protéines de surface du mérozoïte : rôle dans l'adhésion	46
B). Protéines de pénétration	53
Publications	61
Article N°1 : Redescription of <i>Babesia capreoli</i> (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>): Isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from <i>Babesia divergens</i>	63
Article N°2 : Molecular cloning and genetic polymorphism of <i>Babesia capreoli</i> gene <i>Bcp37/41</i> , an orthologue of <i>Babesia divergens</i> merozoite surface antigen <i>Bd37</i>	73
Article N°3 : New cellular and molecular insights into the process of <i>Babesia divergens</i> invasion of bovine erythrocytes	95
Article N°4 : : Characterization, localization, expression and genetic variability of <i>Babesia divergens</i> Rhoptry-Associated Protein 1 (RAP-1)	125

Discussion générale	157
Conclusions et perspectives	169
Références bibliographiques	175
Annexes	195

Liste des figures

- Figure 1.** Distribution de la babésiose bovine en France (Photo : M. L'Hostis)
- Figure 2.** Morphologie de *B. divergens* cultivé dans des hématies de différentes espèces animales (Photos L. Malandrin)
- Figure 3.** Cycle biologique d'*I. ricinus* (Gray et Kaye, EUCALB)
- Figure 4.** Cycle de développement de *Babesia spp.* chez la tique et son hôte vertébré, le bovin (Mehlhorn and Walldorf, 1998)
- Figure 5.** Classification des Apicomplexa (Mehlhorn and Walldorf, 1998)
- Figure 6.** Arbre phylogénique des espèces de *Babesia* et de *Theileria* basé sur les séquences entières du gène ARNr 18S (Criado-Fornelio et al., 2003)
- Figure 7.** Structure du mérozoïte et organelles du complexe apical de *Plasmodium falciparum* (Kats et al., 2008)
- Figure 8.** Structure du mérozoïte de *Babesia sp* et de *B. bovis* en microscopie électronique (Dowling et al., 1996; Lehtinen et al., 2008)
- Figure 9.** Culture de *B. divergens* dans les globules rouges de mouton *in vitro* montrant les différents stades de développement intra-érythrocytaire du parasite (Photo L. Malandrin)
- Figure 10.** Représentation schématique du processus d'invasion du globule rouge par *Babesia bovis* (Yokoyama et al., 2006)
- Figure 11.** Sécrétion du contenu des organelles du complexe apical et invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte de *P. knowlesi* (Preiser et al., 2000)
- Figure 12.** Protéines impliquées dans le processus d'invasion des globules rouges par *Babesia bovis* (Yokoyama et al., 2006)
- Figure 13.** Structure de l'ancre Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) (Jasmer et al., 1992a)
- Figure 14.** Structure du locus de *msa-2* de deux isolats géographiquement éloignés de *B. bovis* (Berens et al., 2005)
- Figure 15.** Variation de la séquence en acides aminés de la protéine MSA-1 de 16 souches de *B. bovis* d'origines géographiques diverses (LeRoith et al., 2006)
- Figure 16.** Structure de la région hypervariable de la protéine MSA-1 contenant des motifs

dégénérés riches en proline (LeRoith et al., 2006)

Figure 17. Alignement de séquences de Bd37 obtenues à partir de différents isolats de *B. divergens* (Hadj-Kaddour et al., 2007)

Figure 18. Identification chez *B. divergens* de 5 haplotypes de *Bd37* par PCR-RFLP pour 14 isolats de *B. divergens* (Hadj-Kaddour et al., 2007)

Figure 19. Structure du locus *rap-1* de *B. bovis* (isolat Mo7) (Suarez et al., 1998)

Figure 20. Structure du locus *rap-1* de *B. bigemina* (isolat JG-29) (Suarez et al., 2003)

Liste des tableaux

Tableau 1. Paramètres morphologiques de *Babesia divergens* infectant des globules rouges de différentes espèces animales (Zintl et al., 2003)

Liste des annexes

Annexe 1. Alignement des séquences nucléotidiques du gène ADNr 18S de *B. capreoli* et *B. divergens*

Annexe 2. 1) Réactions sérologiques croisées entre *B. capreoli* 2801 et *B. divergens* Rouen 87 F5 observées en utilisant un anticorps polyclonal de lapin immunisé avec des extraits de mérozoïtes de *B. divergens* (multi-souches). A) *B. capreoli* 2801 ; B) *B. divergens* Rouen 87 F5

2) Analyse par Western blot des protéines responsables de réactions sérologiques croisées observées en IFAT. 1, *B. capreoli* 2770; 2, *B. divergens* Rouen87 F5; M, Marqueurs (Bio-Rad). Les protéines reconnues sont indiquées par les étoiles (*), et une protéine immunodominante de 38kDa est marquée par une flèche

Annexe 3. Marquage de la surface du mérozoïte de *B. divergens* Rouen 87 F5 l'anticorps monoclonal 5D6 qui reconnaît Bd37.

Annexe 4. Alignement des séquences nucléotidiques du gène rap-1 de *B. divergens* Drumaness et Rouen 87 F5 (Skuce et al., 1996 ; référence Genbank : Z49818.1)

Annexe 5. Carte de distribution géographique des clones de *B. divergens* échantillonnés pour les analyses de conservation du gène *rap-1*

Liste des abbréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
ADNg : Acide Désoxyribonucléique Génomique
ADNr : Acide Désoxyribonucléique Ribosomal
AMA : Apical Membrane Antigen
ARN : Acide Ribonucléique
ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomal
BCIP/NBT : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GR : Globule Rouge
GPI : Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HVR : HyperVariable Region
IFAT : Indirect Fluorescence Antibody Test
IG : Régions intergéniques
kDa : Kilo-Dalton
LC-MS : Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
MSA : Merozoite Surface Antigen
MW : Molecular Weight
NBP : Normocyte Binding Proteins
ORF : Open Reading Frame
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PBST : PBS tween
PCR : Polymerase Chain Reaction
Q-TOF : Quadripole – Time of fly
RACE : Rapid Amplification of cDNA End
RAMA : Rhoptry Associated Membrane Antigen
RAP : Rhoptry Associated Protein
RBC : Red Blood Cell
RBL : Reticulocyte-Binding-Like
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
pI : Point isoélectrique
rpm : rotation par minute
RT : Room Temperature
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SBP : Spherical Body Protein
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SUB: serine subtilisin-like
TRAP : Thrombospondin-Related Anonymous Protein
VMSA : Variable Merozoite Surface Antigen

Introduction

Objectifs

Babesia est un parasite très répandu dans le monde avec à ce jour plus d'une centaine d'espèces décrites et encore beaucoup d'autres à découvrir (Hunfeld et al., 2008). Ses caractéristiques sont d'infecter les hématies d'une très vaste gamme d'hôtes vertébrés et d'être transmis de façon vectorielle par des tiques dures de la famille des *Ixodidae*. Son cycle de vie comporte donc deux hôtes, bien différents puisque l'un est vertébré et l'autre invertébré, mais chez ces 2 hôtes, *Babesia* est capable de persister à long terme (Chauvin et al., 2009). Même si la présence des *Babesia* chez leur hôte vertébré est le plus souvent asymptomatique, le développement de ces parasites dans les hématies « s'emballe » parfois provoquant alors une maladie appelée babésiose ou piroplasmose. Cette maladie se caractérise par de la fièvre, une anémie hémolytique et une hémoglobinurie et son issue peut être fatale. Elle provoque de ce fait des pertes économiques importantes en élevage, particulièrement en zone tropicale et subtropicale. L'Homme n'est pas à l'abri, puisqu'à ce jour au moins trois espèces de *Babesia* peuvent l'infecter : *B. divergens*, *Babesia sp.* EU1 et *Babesia sp.* MO1 (Herwaldt et al., 1996; Gorenflot et al., 1998; Herwaldt et al., 2003). Même si les enjeux pour la santé humaine ne sont en rien comparables à ceux de la malaria, provoquée par d'autres hémoparasites du genre *Plasmodium* (Welch, 1897), le caractère zoonotique de ces parasites est à prendre en considération.

La spécificité d'hôte vertébré des espèces de *Babesia* était décrite comme relativement étroite avec une espèce de *Babesia* infectant une espèce animale. Mais le développement des outils moléculaires a modifié notre vision de cette spécificité. Ainsi, les espèces *B. bovis* et *B. bigemina*, décrites comme des pathogènes des bovins en zone tropicale, sont capables d'infecter également le cerf à queue blanche (Cantu et al., 2007). Un des cas les plus extrêmes est celui de *B. divergens*, autre parasite des bovins, mais cette fois-ci en zone tempérée. Il est capable d'infecter une très large gamme d'hôtes s'ils sont splénectomisés (Homme, primates, ongulés tels que le chevreuil, le daim, le cerf, le mouflon et le mouton, rongeur tel que le rat) ou non splénectomisés (bovins, rennes, mouton et gerbille de Mongolie) (Chauvin et al., 2009). Chez *Babesia*, la spécificité d'hôte pourrait s'expliquer principalement par l'incapacité du parasite à s'introduire dans les globules rouges, et/ou à y survivre et s'y multiplier et/ou à en sortir pour infecter d'autres cellules. Une étude menée dans notre laboratoire sur le mouton a mis en

évidence un lien entre sensibilité des hématies in vitro et sensibilité de l'hôte non splénectomisé (Malandrin et al., 2009). L'étude des mécanismes responsables de la spécificité peut donc s'envisager au niveau cellulaire par des études in vitro, et le modèle *B. divergens*/érythrocyte est particulièrement bien adapté pour ces travaux.

B. divergens fait partie du phylum des Apicomplexes, comme *Plasmodium* et *Theileria*. Les parasites de ce phylum sont caractérisés par la présence, au pôle apical des formes infectieuses pour l'hématie (mérozoïtes et sporozoïtes), d'un ensemble d'organelles unique appelé le complexe apical. Ce complexe comporte des micronèmes, des rhoptries et des granules denses, et chacun de ces organelles renferme des protéines qui ont un rôle dans le processus d'invasion du globule rouge et probablement dans sa viabilité au sein de la cellule hôte. Ces molécules interagissent avec la cellule hôte pour permettre par exemple l'attachement et l'internalisation du parasite, la mise en place d'une vacuole parasitophore fonctionnelle qui assurera les échanges trophiques nécessaires au développement du parasite, la destruction de cette vacuole et de l'érythrocyte pour permettre sa sortie. Les connaissances sur ces interactions sont très éparpillées chez *Babesia* et le nombre connu de protéines impliquées dans ces processus est limité à quelques unes. Un des objectifs de la thèse est d'améliorer les connaissances dans ce domaine en mettant en place des outils d'étude du processus d'invasion et en caractérisant des protéines impliquées.

L'étude des mêmes gènes impliqués dans l'invasion de l'érythrocyte chez une espèce parasitaire phylogénétiquement proche au spectre d'hôtes vertébrés chevauchant, mais avec des espèces différentielles, est un outil de valeur dans l'étude des molécules impliquées dans la spécificité. Dans le cas de *B. divergens*, l'espèce *B. capreoli* présente toutes ces caractéristiques (Enigk and Friedhoff, 1962a, b; Gray et al., 1990) et fera l'objet d'une partie de mon travail de thèse. Pour ce travail, la variabilité génétique des gènes d'intérêt doit être analysée au sein de chaque espèce afin de distinguer des caractéristiques propres et conservées pour chacune des espèces et différentes entre les deux espèces.

Dans ce cadre très large d'objectifs à long terme, mon travail de thèse s'est articulé autour de 3 objectifs :

1- Mettre en évidence chez *B. capreoli* des orthologues de protéines impliquées dans l'invasion chez *B. divergens*. Avant d'effectuer ce travail, j'ai tout d'abord participé aux travaux permettant la redéfinition de l'espèce *B. capreoli* sur des bases moléculaires (Article 1 - publié). La protéine la mieux caractérisée chez *B. divergens* est Bd37, une protéine de surface du mérozoïte de *B. divergens*, impliquée dans l'adhésion du parasite au globule rouge. Dans cette thèse, la conservation de cette protéine chez *B. capreoli*, une espèce très proche de *B. divergens* a été étudiée. (Article 2 – en révision).

2- Mettre au point un test d'invasion des globules rouges par *B. divergens*. Les applications d'un tel test sont multiples. Il permet d'étudier les étapes du processus cellulaire d'invasion, d'obtenir une culture parasitaire synchronisée, d'analyser l'inhibition de l'invasion à l'aide d'anticorps afin d'identifier les molécules impliquées (Article 3 - soumis).

3- Caractériser des protéines (localisation, expression et variabilité génétique) impliquées dans l'invasion chez *B. divergens* et, dans le cadre de ma thèse, RAP-1 (Article 4 – à soumettre).

Le manuscrit exposant cette étude est divisé en trois chapitres. Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique en trois parties est proposée. Elle présente d'abord les caractéristiques de *B. divergens*, de la babésiose bovine, de la transmission de ce parasite, de son cycle de vie, de sa position phylogénétique parmi les autres Apicomplexa et les autres espèces de *Babesia* présentes sur les mêmes hôtes vertébrés. Puis une description du processus d'invasion de l'érythrocyte par les Apicomplexes en se basant principalement sur les données nombreuses concernant un autre hémoprotozoaire, *Plasmodium*, est apportée. Une troisième partie fait le point sur l'état des connaissances à propos des protéines impliquées dans le processus d'invasion, en se limitant aux protéines pour lesquelles des données existent chez *Babesia*. Dans le deuxième chapitre « Publications », les modes opératoires, résultats et discussion sont présentés sous forme d'articles. Une discussion générale de l'ensemble des travaux et de leurs perspectives clôt ce manuscrit.

Synthèse bibliographique

Babesia divergens

Babesia divergens est un protozoaire parasite du phylum des *Apicomplexa*, Classe des *Piroplasmae*, Ordre des *Piroplasmida*, Famille des *Babesiidae* (Levine and Campbell, 1971; Levine and Ivens, 1988). Il a été découvert par M'Fadyean et Stockman en Angleterre en 1911. Il se développe pour une partie de son cycle dans les hématies de certains vertébrés, et principalement des bovins, et pour l'autre partie dans son vecteur, qui est une tique dure de la famille des *Ixodidae*, *Ixodes ricinus*.

A). La babésiose bovine à *B. divergens*

B. divergens est responsable d'une maladie touchant principalement les bovins : la babésiose ou piroplasmose bovine.

i). Epidémiologie

A ce jour, plus de 100 espèces de babésies sont décrites (Kuttler et al., 1988; Levine and Ivens, 1988). Six espèces de *Babesia* (*Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. ovata* and *B. orientalis*) sont responsables de babesioses bovines dans le monde. En France, *B. divergens* est l'espèce la plus commune. Ce parasite est zoonotique, pouvant entraîner une maladie mortelle chez les individus immunodéprimés (Gray, 2006; Hunfeld et al., 2008).

La distribution de la babésiose chez les bovins est très large et coïncide avec la distribution de la tique vectrice, *I. ricinus*. La prévalence est plus forte dans l'Ouest et le Centre de la France, zones d'élevage bovin (L'Hostis et al., 1995) (Figure 1).



Figure 1. Distribution de la babésiose bovine en France
(Photo : M. L'Hostis)

En France, l'incidence de la maladie est de 0,4% par an en moyenne (L'Hostis and Chauvin, 1999), avec un plus fort taux d'animaux porteurs asymptomatiques séropositifs (20% en moyenne) (Devos and Geysen, 2004). Ainsi, de nombreux bovins sont infectés sans exprimer de signes cliniques. Chez ces animaux, le parasite peut persister très longtemps, jusqu'à plusieurs années. Les porteurs asymptomatiques constituent une source de contamination constante et entretiennent ainsi la présence du parasite au sein du troupeau d'une région (Zintl et al., 2003). Les cas de babésiose sont plutôt observés sur des animaux âgés de plus de trois ans, la résistance à la maladie diminuant avec l'âge des animaux (Christensson, 1989).

L'apparition de la maladie est directement dépendante de l'activité des tiques. Deux pics de babésiose sont observés dans l'année : un au printemps et un à l'automne, correspondant aux deux pics d'activité des nymphes et des formes adultes du vecteur (Gray, 1980; L'Hostis and Chauvin, 1999). L'incidence maximale des cas de babésiose a lieu en général deux semaines après le pic d'activité des tiques. Ce délai correspond au temps requis pour l'attachement des tiques, leur gorgement et l'incubation de la maladie (Gray, 1980).

ii). Symptômes

Les infections par *B. divergens* sont le plus fréquemment asymptomatiques ou se manifestent par des symptômes discrets et non spécifiques (L'Hostis, 1995). Les symptômes observés sont liés à la lyse des globules rouges et au syndrome infectieux général. On observe principalement fièvre, anémie hémolytique, ictère, hémoglobinurie et troubles nerveux, pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal (Zintl et al., 2003). Le signe nécropsique principal est l'hypertrophie de la rate.

Les formes cliniques sont à l'origine de pertes économiques du fait du retard de croissance et de la baisse de production de lait qu'elles peuvent entraîner (McCosker, 1981).

iii). Diagnostic

Plusieurs méthodes sont disponibles pour réaliser le diagnostic de la babésiose à *B. divergens* (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008). Le diagnostic direct (recherche du parasite), plutôt utilisé pour confirmer une suspicion clinique, se fait par hématologie (observation directe d'étalement sanguin coloré au May Grünwald Giemsa), xénodiagnostic (infection de gerbille), culture in vitro ou recherche de l'ADN parasitaire par PCR. L'infection de gerbille de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) est une caractéristique spécifique de *B. divergens* (Lewis and Williams, 1979), qui permet de le distinguer des autres espèces. L'infection peut être détectée avec des gerbilles inoculées avec au moins $10^3 - 10^4$ parasites (Hentrich and Böse, 1993). Cette technique a été remplacée par la culture in vitro. La culture in vitro de *B. divergens* a une sensibilité similaire aux méthodes de PCR mais avec un délai d'obtention des résultats plus longs (jusqu'à un mois) (Malandrin et al., 2004a). Le diagnostic par analyse moléculaire avec séquençage du gène ADNr *18S* amplifié par PCR permet de différencier les cas de babésiose bovine à *B. bovis*, *B. bigemina*, ou *B. major* et est utilisé également dans le cas de babésiose humaine lors d'infection avec *B. sp* EU1 (Gray, 2006). Un autre gène, le gène *Bd37* peut être utilisé pour la détection de *B. divergens* (Delbecq et al., 2002), mais aucune méthode standardisée n'est disponible actuellement.

Le diagnostic indirect (sérologique) est plutôt utilisé pour les études épidémiologiques. L'immunofluorescence indirecte (IFAT : Indirect Fluorescence Antibody Test) permet de

déterminer le statut immunologique d'un troupeau. Le test Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) est plus sensible pour la détection de l'augmentation des anticorps après l'infection. C'est une méthode efficace pour la détection de nouvelles infections (Chauvin et al., 1995). Du fait de l'existence de réactions croisées entre les différentes espèces de *Babesia*, les techniques sérologiques ne sont pas suffisamment spécifiques pour identifier l'espèce parasitaire incriminée (Hunfeld et al., 2008).

iv). Traitement et prévention

La plupart des cas de babésiose guérissent sans traitement spécifique. Aujourd'hui, l'imidocarbe dipropionate (Imizol ; CarbesiaND ; Schering Plough) est le seul produit commercialisé pour traiter les babesioses bovines en Europe (Homer et al., 2000). Une injection d'imidocarbe peut protéger contre les manifestations cliniques pendant une période de 3 à 6 semaines (Taylor and McHardy, 1979). Cette molécule injectée à deux fois la dose thérapeutique s'est également avérée avoir un effet prophylactique efficace. Toxique lorsqu'il est administré par voie intraveineuse, l'administration par voie intra-musculaire ou sous-cutanée est généralement recommandée (Taylor and McHardy, 1979).

La prévention passe essentiellement par le contrôle des populations de tiques (araricides sur les bovins, entretien des pâturages). Aucun vaccin réellement efficace n'est disponible actuellement (Zintl et al., 2003).

B). Biologie de *B. divergens*

i). Le spectre d'hôtes de *B. divergens*

La faible spécificité d'hôtes de *B. divergens* a pu être mise en évidence in vivo et in vitro (Gorenflot et al., 1991; Chauvin et al., 2002; Zintl et al., 2002; Malandrin et al., 2010). Ce parasite possède l'une des plus large gamme d'hôte décrites chez les espèces de *Babesia* à ce jour (Chauvin et al., 2009). L'hôte naturel le plus connu est le bovin, mais on le trouve aussi naturellement chez les rennes (Langton et al., 2003). Bien que les babésioses soient surtout connues comme maladies d'importance vétérinaire (Zintl et al., 2003), le potentiel zoonotique de *B. divergens* n'est pas négligeable et des cas cliniques, parfois mortels, ont été décrits chez des personnes immunodéprimées, le plus souvent splénectomisées (Zintl et al., 2003; Gray, 2006; Hunfeld et al., 2008).

Expérimentalement, l'infection par *B. divergens* a pu être démontrée chez des mammifères splénectomisés (primates : chimpanzé, singe rhesus (Garnham, 1959), ongulés : chevreuil, daim, cerf, mouflon et mouton (Enigk and Friedhoff, 1962a; Chauvin et al., 2002) et rongeurs : rat (Phillips, 1984)) et non splénectomisés (renne, mouton et gerbille de Mongolie (Nilsson et al., 1965; Lewis and Williams, 1979; Malandrin et al., 2009)).

In vitro, la culture de *B. divergens* peut être maintenue à long terme dans les GR de rats, de bovins, d'ovins, de chevreuils, de daims et de l'homme (Phillips, 1984; Gorenflot et al., 1991; Chauvin et al., 2002; Zintl et al., 2002; Malandrin et al., 2010). La culture de *B. divergens* peut être réalisée également dans les GR de cheval ou d'âne mais la survie parasitaire est alors de courte durée (Schuster, 2002; Zintl et al., 2002).

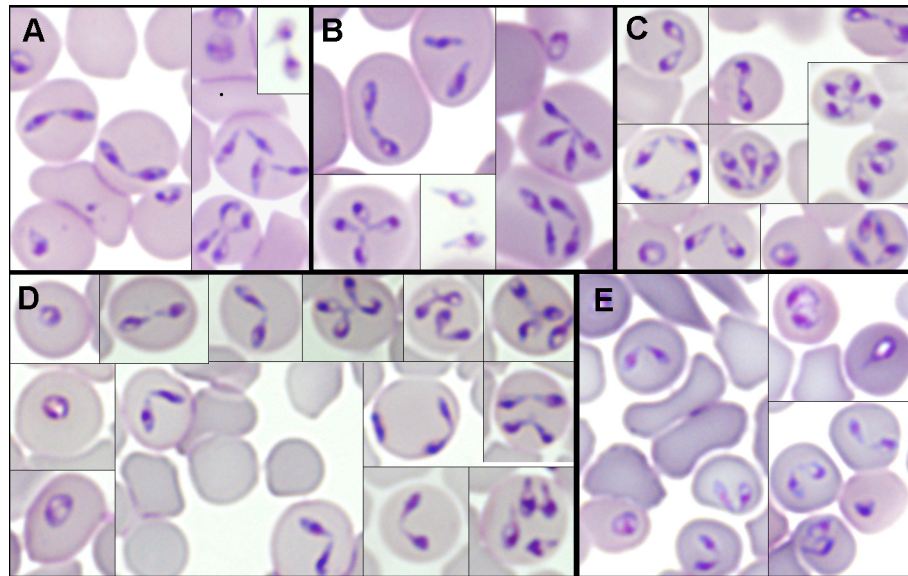


Figure 2. Morphologie de *B. divergens* cultivé dans des hématies de différentes espèces animales

(Photo L. Malandrin)

A : GR mouton ; B : GR bovin ; C : GR humain ; D : GR Chevreuil ; E : GR Daim

ii). Transmission de *B. divergens* par la tique *I. ricinus*

La babesiose bovine est une maladie vectorielle. Les vecteurs sont les tiques dures de la famille des *Ixodidés*. L'espèce de tique vectrice diffère selon les espèces de *Babesia*. Dans le cas des babesioses bovines, les vecteurs sont *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pour *B. bovis* et *B. bigemina*, *Haemaphysallis punctata* pour *B. major* et *I. ricinus* pour *B. divergens*.

I. ricinus est une tique triphasique (trois stades de développement : larve, nymphe et adulte) et polytrope (hôte différent pour chaque stade) (Figure 3). Les larves libres, présentes dans l'environnement, trouvent un hôte (rongeur principalement) et se nourrissent en 2 à 3 jours (Sonenshine, 1991). A réplétion, elles se détachent, tombent au sol et muent. Les nymphes émergeant cherchent un nouvel hôte et se gorgent en 4 à 5 jours. Une fois au sol, une nouvelle phase de mue a lieu, pour donner un individu adulte, mâle ou femelle. Les femelles cherchent un hôte (bovin ou cervidé principalement) pour leur unique repas sanguin. Elles trouvent leur partenaire sexuel soit au sol, soit directement sur l'hôte. Le mâle ne se gorge pas et féconde la femelle. La femelle ne se gorge totalement (en 7 à 8 jours) que si elle a été fécondée. A réplétion, elle se détache, trouve au sol un endroit favorable pour y pondre entre 2000 et 5000 oeuf puis meurt. Les oeuf éclosent et donnent des larves, prêtes à se gorger sur un nouvel hôte. Chaque

phase de transformation (mues ou éclosion) dure un mois environ. Des phases de diapause interviennent dans ce cycle biologique, notamment en période froide. La durée totale du cycle, d'une génération à l'autre, dure en moyenne de 2 à 4 ans.

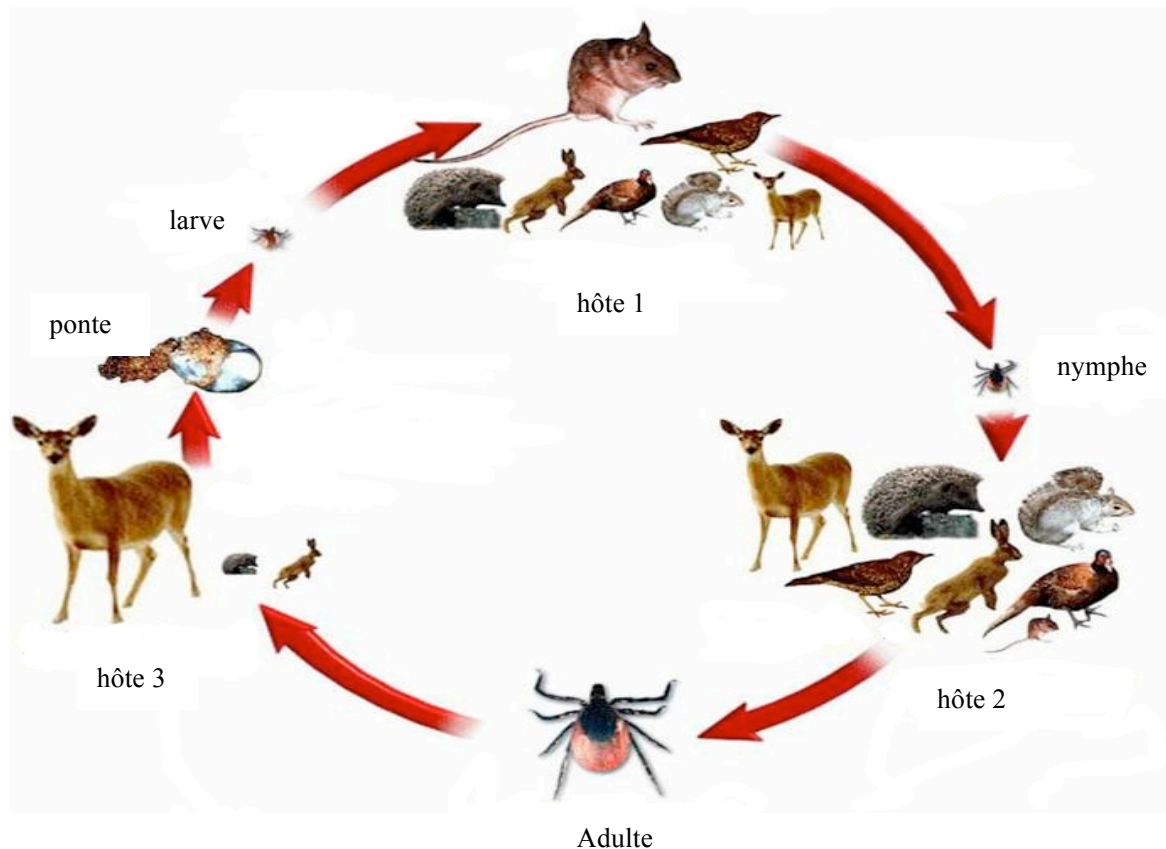


Figure 3 : Cycle biologique d'*I. ricinus*

(D'après Gray et Kaye, EUCALB)

La taille relative des animaux représentés sur le cycle donne une indication approximative de leur participation quantitative en tant qu'hôte des différents stades de la tique.

Les tiques constituent le réservoir majeur de *B. divergens* grâce à la transmission trans-stadiale et trans-ovarienne du parasite (Zintl et al., 2003). Après l'infection d'une tique adulte par gorgement sur un bovin infecté, les sporokinètes formés au niveau du tube digestif de la tique envahissent ses ovaires et infectent les oeufs, assurant la transmission trans-ovarienne. La transmission trans-ovarienne chez les tiques est une caractéristique du genre *Babesia* et permet la retransmission du parasite acquis par l'adulte à la génération suivante. Par ailleurs, les nombreux cycles sporogoniques ayant lieu dans les différents organes de la tique permettent la persistance du parasite dans l'individu au cours de la mue, assurant la transmission

trans-stadiale. Ceci permet le maintien de l'infection parasitaire au sein de la population de vecteurs, sans nouvelle acquisition. Le parasite peut ainsi persister au sein de la population de tiques pendant plusieurs années, du fait de la durée du cycle de la tique (Joyner and Donnelly, 1979).

iii). Cycle de développement parasitaire de *Babesia* spp.

Le cycle biologique de *B. divergens* se divise principalement en 3 parties : mérogonie, gamogonie et sporogonie. Une phase de reproduction asexuée du parasite, la mérogonie, a lieu dans les globules rouges de l'hôte vertébré, alors que la reproduction sexuée, la gamogonie, ainsi qu'une autre phase de multiplication asexuée, la sporogonie, ont lieu dans la tique vectrice.

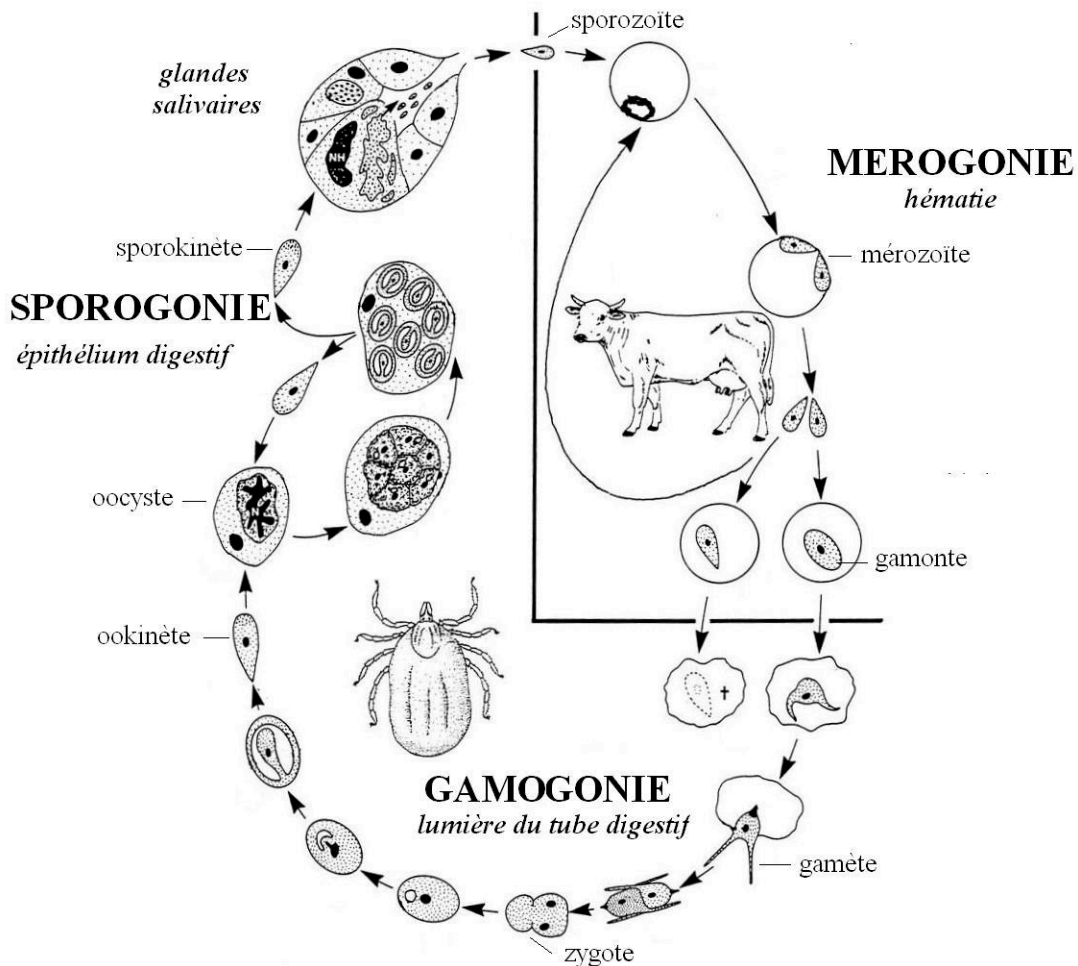


Figure 4 : Cycle de développement de *Babesia* spp. chez la tique et son hôte vertébré, le bovin

(D'après Mehlhorn et Walldorf, 1998)

Mérogonie

L'infection de l'hôte vertébré par *B. divergens* débute lors d'une piqûre de tique, par l'injection de sporozoïtes produits dans les glandes salivaires de la tique. Après son passage dans le courant sanguin et suite à sa pénétration active dans le globule rouge, le parasite se retrouve dans le cytoplasme entouré de la membrane érythrocytaire, formant la vacuole parasitophore qui, chez les *Babesia*, semble ensuite être détruite (Mehlhorn and Schein, 1984). Un trophozoïte est obtenu qui se divise pour donner des mérozoïtes. Les mérozoïtes, libérés par lyse du globule rouge, infectent de nouveaux globules rouges (Mehlhorn and Schein, 1984). Cette phase de multiplication asexuée chez l'hôte vertébré est appelée mérogonie. Certains trophozoïtes ne se divisent pas, grossissent et restent dans le globule rouge. Ils sont à l'origine des formes sexuées appelés gamontes ou gamétocytes. Ils ne poursuivront leur évolution que s'ils sont ingérés par une tique lors d'un autre repas sanguin (Mehlhorn and Schein, 1984).

Gamogonie

Le développement de *B. divergens* dans la tique est connu avec moins de précision. Les différentes phases sont donc pour la plupart extrapolées à partir d'observations faites chez d'autres espèces de *Babesia* (Mehlhorn and Schein, 1984).

Lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté, la tique ingère des globules rouges parasités et débute alors la phase de reproduction sexuée : la gamogonie. Seuls les gamétocytes vont évoluer dans le tube digestif de la tique, toutes les formes asexuées ingérées étant détruites. Dans la lumière intestinale de la tique, les gamétocytes se transforment en gamètes et deux gamètes fusionnent pour donner un zygote. Ce zygote se différencie en ookinète et migre dans les cellules épithéliales intestinales.

Sporogonie

Suite à la pénétration de l'ookinète dans l'épithélium digestif, une phase de multiplication asexuée commence : la sporogonie (Friedhoff, 1981; Young and Morzaria, 1986). L'ookinète se divise pour donner naissance à de nombreux sporokinètes, qui vont migrer dans tout le corps de la tique via l'hémolymphe. Au niveau des glandes salivaires, le sporokinète se développe jusqu'au stade de sporonte. Quand la tique effectue un nouveau repas sanguin sur un hôte

différent, des sporozoïtes infectants sont formés et transmis au vertébré lors de l'injection de salive. Une nouvelle phase de mérogonie peut alors commencer dans les globules rouges du bovin nouvellement infecté.

C). *B. divergens* et les autres Apicomplexa

Le genre *Babesia* est classé dans le phylum des *Apicomplexa*, la classe *Sporozoasida*, l'ordre des *Piroplasmorina* et la famille des *Babesiidae* (Levine and Campbell, 1971; Levine and Ivens, 1988).

i). Classification des Apicomplexa

Le phylum des Apicomplexa regroupe des agents pathogènes ayant une grande importance médicale et vétérinaire (figure 5). Ils possèdent, comme leur nom l'indique, un complexe apical intracellulaire formé de différents organelles impliqués dans le processus d'invasion cellulaire.

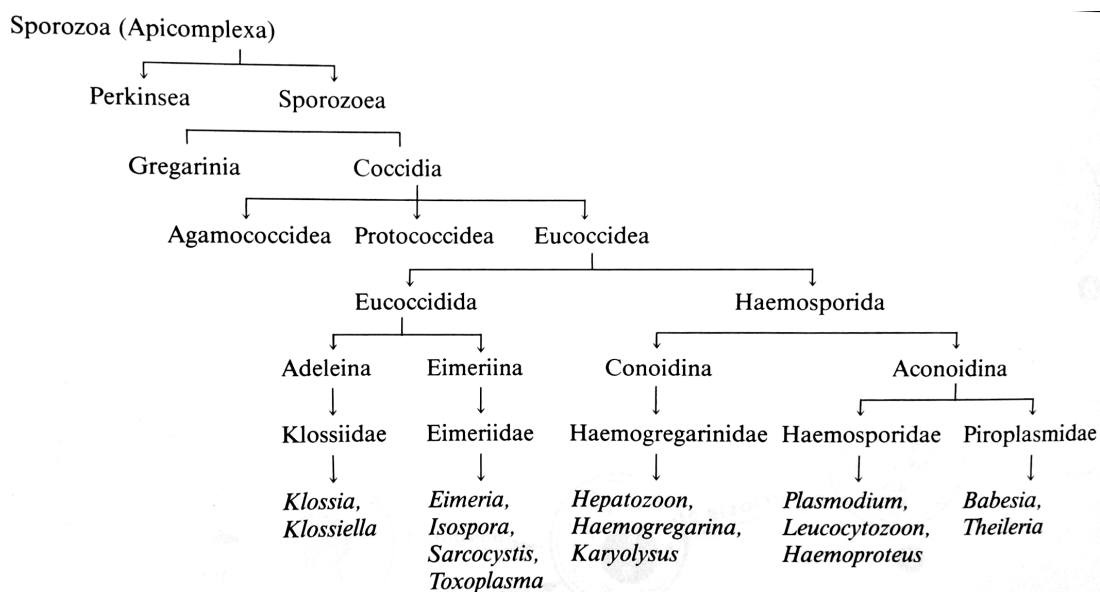


Figure 5 : Classification des Apicomplexa

(D'après Mehlhorn and Walldorf, 1998)

Chez les *Haemosporida*, *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) est une des espèces de *Plasmodium* responsable de la malaria (paludisme) chez l'homme. Il est transmis par les moustiques *Anopheles gambiae* (vecteur principal), *A. albimanus*, *A. freeborni*, *A. maculatus* et

A. stephensi. Le cycle de vie de *Plasmodium* est plus complexe que celui de *Babesia*. Le parasite passe des glandes salivaires de l'anophèle à la circulation sanguine de l'individu sous forme de sporozoïtes. Avant la multiplication asexuée des mérozoïtes dans les érythrocytes, les sporozoïtes atteignent le foie et infectent les hépatocytes rapidement pour se transformer en mérozoïtes.

Le genre *Theileria* regroupe principalement des parasites des ruminants. *T. parva* et *T. annulata* sont deux espèces particulièrement pathogènes pour le bovin qui provoquent une maladie lymphoproliférative souvent mortelle. *T. parva* est transmis par la tique *Rhipicephalus appendiculatus* alors que *T. annulata* est transmis par plusieurs espèces de *Hyalomma*. A la différence de *Babesia*, les *Theileria* peuvent être transmis chez la tique de façon trans-stadiale mais pas trans-ovarienne. De plus, les *Theileria* ont une première phase de schizogonie dans les lymphocytes alors que les *Babesia* se multiplient exclusivement dans les hématies.

ii). Classification de *Babesia* spp.

Actuellement, plus de 100 espèces de *Babesia* ont été décrites (Kuttler et al., 1988; Levine and Ivens, 1988). Elles ont été historiquement classées, sur la base de la taille du mérozoïte, en « grandes » babésies (plus de 3 µm de longueur, comme par exemple *B. bigemina*, *B. major*, *B. ovata*, *B. motasi*) et « petites » babésies (moins de 3 µm de longueur, comme par exemple *B. bovis*, *B. ovis*, *B. divergens*) (Purnell et al., 1981; Kuttler et al., 1988; Levine and Ivens, 1988). Toutefois, cette classification a été revue à la lumière des données issues d'études génétiques. Les avancées en biologie moléculaire et l'utilisation de séquences ADN permettent une nouvelle approche pour la classification phylogénétique du genre *Babesia* (figure 6). Actuellement, au moins 32 espèces ou souches de babésies reconnues et 85 inconnues sont accessibles sur le site « NCBI-Taxonomy » et la plupart ont des gènes dont les séquences ont été déposées dans « GenBank » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La séquence la plus communément utilisée pour ces études phylogénétiques est celle du gène de la petite sous-unité ribosomale (ARNr 18S) (Allsopp et al., 1994; Criado-Fornelio et al., 2003; Ahmed et al., 2006; Allsopp and Allsopp, 2006; Altay et al., 2007) car elle existe chez tous les organismes vivants, elle contient des régions très conservées, des régions variables et des régions hypervariables et elle n'est pas

traduite en protéine (Woese, 1987; Ludwig and Schleifer, 1994).

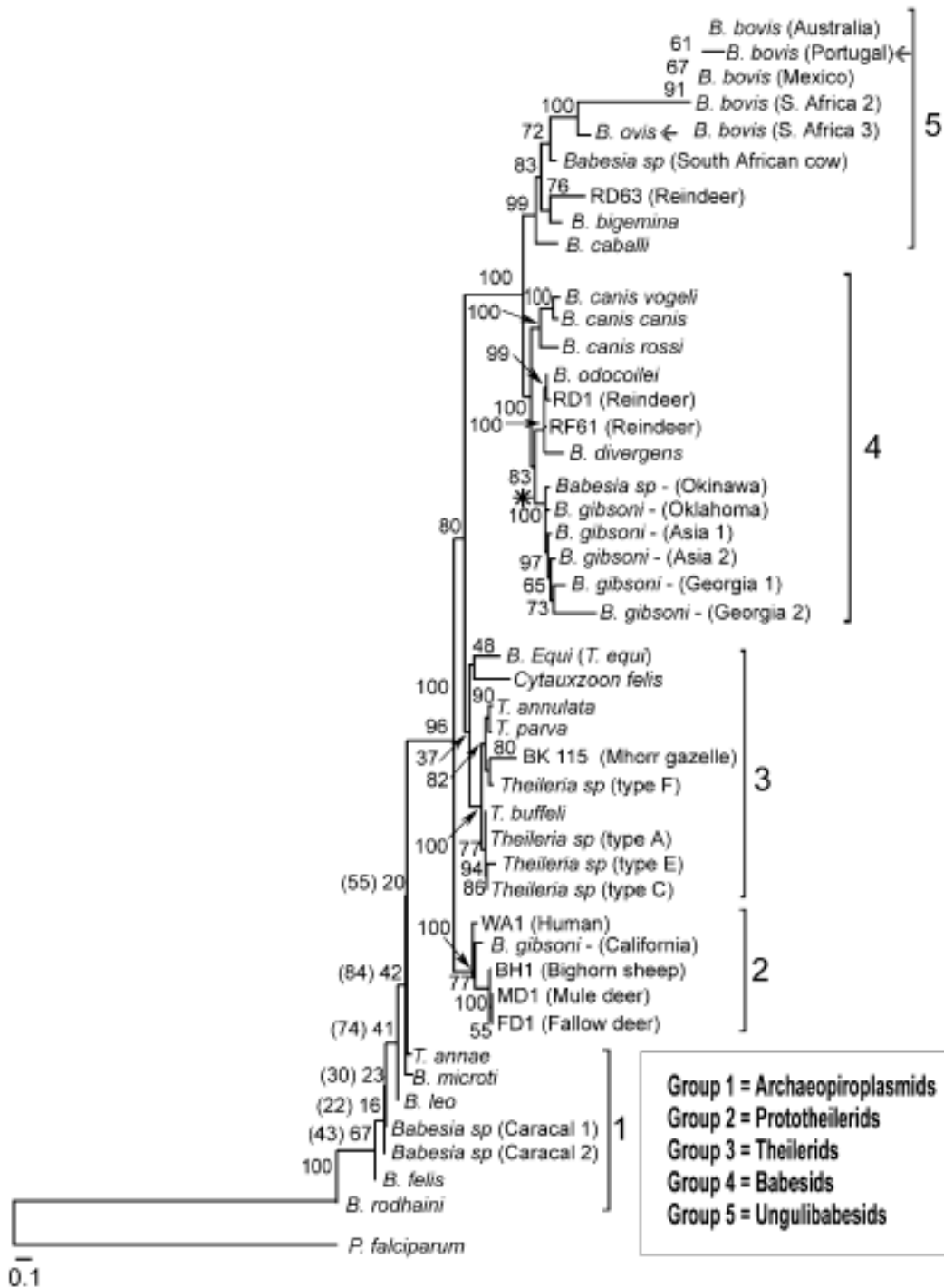


Figure 6 : Arbre phylogénique des espèces de *Babesia* et de *Theileria* basé sur les séquences entières du gène ARNr 18S

(D'après Criado-Fornelio et al., 2003)

Les espèces de *Babesia* se répartissent dans 2 groupes majeurs : les Babesids (groupe 4) et les Ungulibabesids (groupe 5). Dans le groupe 4, il existe trois sous-clades : *B. canis*, *B. gibsoni*, et *B. odocoilei* – *B. divergens*.

iii). *B. divergens* et autres espèces de *Babesia* présentes chez les mêmes hôtes en Europe

Dans cette partie, je vais vous présenter rapidement les connaissances sur les autres espèces de *Babesia* présentes chez l'homme, les bovins et les cervidés, et donc susceptibles de poser des problèmes d'identification avec la présence conjointe de *B. divergens*.

Espèces de *Babesia* responsables des cas de babésiose humaine

En Europe, les cas de babésiose humaine sont le plus souvent attribués à *B. divergens*, mais souvent, le diagnostic est incomplet et les données moléculaires permettant l'identification précise de l'espèce responsable ne sont pas toujours disponibles. Récemment, cette caractérisation moléculaire basée sur l'ARNr 18S a permis d'identifier une nouvelle espèce responsable de cas de babésiose humaine en Autriche, Italie et Allemagne : *Babesia sp.* EU1 (Herwaldt et al., 2003; Haselbarth et al., 2007).

Espèces de *Babesia* infectant les bovins en Europe

Parmi les espèces parasitant les bovins, *B. divergens* est de loin la plus répandue en Europe du nord (Zintl et al., 2003). La présence de *B. major*, dont le vecteur est *Haemaphysalis punctata*, est démontrée, mais son incidence clinique est négligeable. Dans le sud de l'Europe, les espèces plus virulentes, *B. bigemina* et *B. bovis*, sont présentes (Italie, Sicile, Espagne et Portugal) et responsables localement de pertes économiques (Savini et al., 1999; Almeria et al., 2001a, b; Georges et al., 2001; Silva et al., 2009). Au Portugal, la prévalence de ces deux espèces chez des animaux asymptomatiques est très élevée (71% et 34% respectivement pour *B. bovis* et *B. bigemina*) (Silva et al., 2009). *B. bigemina* est retrouvée de plus en plus au nord puisque cette espèce a été responsable d'une flambée de cas cliniques en Suisse survenue en 2002 (Hofmann-Lehmann et al., 2004; Hilpertshausen et al., 2007). L'origine géographique de la souche n'est pas certaine, mais une remontée depuis l'Italie semble l'hypothèse la plus probable (Hilpertshausen et al., 2007).

Espèces de *Babesia* présentes chez les cervidés en Europe

La présence de *B. divergens* chez les cervidés, et principalement chez le chevreuil, est suspectée depuis plusieurs années (Duh et al., 2005) mais les identifications sont souvent partielles et uniquement moléculaires, aboutissant parfois à la dénomination *B. divergens*-like pour les parasites détectés. Les incertitudes quant à la présence de *B. divergens* chez ces hôtes ont deux causes principales. Premièrement, la présence d'une autre espèce de *Babesia*, *B. capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962b), chez les cervidés (chevreuil, cerf, daim), dont la proximité taxonomique avec *B. divergens* est telle que différenciations morphologiques et sérologiques sont impossibles (Gray et al., 1990; Gray et al., 1991). Deuxièmement, le fait que les cervidés peuvent être infectés expérimentalement par *B. divergens* (Enigk and Friedhoff, 1962a), faisant de ces animaux des hôtes potentiels. Toutefois, *B. capreoli* n'est capable d'infecter ni le bovin (Enigk and Friedhoff, 1962b; Gray et al., 1990) ni la gerbille de Mongolie (Gray et al., 1990), respectivement l'hôte naturel et l'hôte expérimental de *B. divergens*. Au début de mon travail de thèse, aucune caractérisation moléculaire de ces deux espèces en lien avec leur gamme d'hôte n'avait été réalisée, ce qui explique les problèmes d'identification de ces deux espèces proches sur des bases moléculaires seules. La clarification taxonomique nécessaire pour ces deux espèces et le développement d'outils de diagnostic et d'épidémiologie basés sur d'autres gènes que l'ARNr 18S, tels que par exemple ceux codant pour des protéines de surface des parasites, font partie de mon travail de thèse et seront présentés dans les articles 1 et 2. Il est en effet important d'apporter pour ces deux espèces des bases moléculaires d'identification précises qui permettront ensuite de déterminer si les cervidés représentent des hôtes pour l'espèce zoonotique *B. divergens*.

Le rôle des cervidés en tant qu'hôtes réservoirs de l'autre espèce zoonotique *Babesia sp.* EU1 a été démontrée dans plusieurs pays d'Europe (Duh et al., 2005; Bonnet et al., 2007; Tampieri et al., 2008), et pour *Babesia sp.* EU1, l'identification moléculaire ne pose pas de doutes.

II. Processus d'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes

Dans l'embranchement des Apicomplexa, les parasites appartenant à 3 genres principaux ont pour caractéristique de parasiter les globules rouges de leur hôte : *Plasmodium*, *Theileria*, *Babesia*. Contrairement à *Plasmodium* et *Theileria* dont les membres ont la capacité d'envahir d'autres types cellulaires chez l'hôte vertébré (respectivement hépatocytes et lymphocytes), les parasites du genre *Babesia* sont strictement inféodés aux globules rouges de leur hôte vertébré. La comparaison des processus et des bases moléculaires sous-jacents entre ces trois genres devrait permettre à long terme de dégager les spécificités des processus d'invasion de ces types cellulaires. *Babesia* présente une autre caractéristique fondamentale qui la différencie de *Plasmodium* et qui en fait donc un modèle comparatif d'intérêt : la non persistance de la vacuole parasitophore au cours du développement intra-érythrocytaire. Comme les recherches sur le processus d'invasion sont beaucoup plus avancées pour *Plasmodium*, la synthèse bibliographique présentée ici regroupera les données actuelles sur *Babesia*, élargies aux connaissances acquises grâce aux nombreux travaux sur *Plasmodium*, qui est phylogénétiquement et biologiquement proche de *Babesia*.

A). Le mérozoïte : forme parasitaire infectant l'érythrocyte

Le mérozoïte et le sporozoïte sont les 2 formes asexuées du parasite qui infectent les GR de l'hôte vertébré. Les mérozoïtes ont été plus étudiés en raison de la facilité de leur production in vitro.

i). Méthodes de production et d'isolement du mérozoïte

Le cycle de reproduction asexuée de *B. divergens* chez le bovin peut être étudié assez facilement car il peut être reproduit in vitro non seulement à l'aide de GR bovins mais aussi humains (Gorenflot et al., 1991) ou ovins (Chauvin et al., 2002). La production in vitro des mérozoïtes et leur isolement permet d'étudier leur structure, le processus d'invasion aux niveaux cellulaires et moléculaires ainsi que de réaliser des infections expérimentales.

Après obtention in vitro d'une parasitémie suffisamment élevée (5 à 10%), plusieurs

méthodes décrites dans la littérature peuvent être utilisées pour lyser les GR afin d'isoler les mérozoïtes. Les GR parasités peuvent être lysés par des méthodes chimiques (saponine) (Siddiqui et al., 1979) ou mécaniques (choc osmotique provoqué par du glycérol ou du NH₄Cl ou par l'électroporation) (Figueroa et al., 1990; Machado et al., 1994; Franssen et al., 2003). Les mérozoïtes libres présents dans la culture de *B. bovis* peuvent être séparés des hématies parasitées ou non par gradient de densité grâce au Percoll (Amersham Biosciences) utilisé à une densité de 1,08g/mL (Rodriguez et al., 1986).

ii). Structure du mérozoïte

Quel que soit le genre, les mérozoïtes des Apicomplexes ont tous une morphologie et une ultrastructure comparable (figure 5). Ils sont en forme de poire, avec un pôle apical en pointe. Ils sont entourés d'un manteau composé d'une membrane cellulaire extérieure et d'une couche interne osmiophile. Le cytoplasme contient un noyau, des mitochondries, ainsi que des microtubules et le plastide. Le complexe apical, qui a donné le nom aux Apicomplexes, est localisé au niveau du pôle apical et est composé d'organelles impliqués dans le processus d'invasion de la cellule cible : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses, appelés corps sphériques dans le genre *Babesia*.

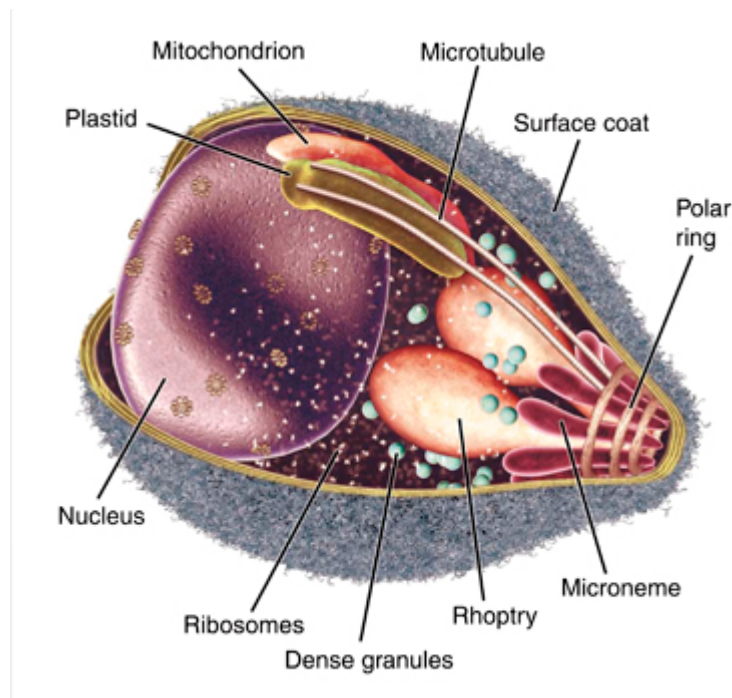


Figure 7 : Structure du mérozoïte et organelles du complexe apical de *Plasmodium falciparum* (D'après Kats et al. 2007)

iii). Les organelles du complexe apical

Les rhoptries

Les rhoptries sont les organelles du complexe apical les plus volumineux. Leur nom fait allusion à leur forme de massue observable en microscopie électronique (figure 8).

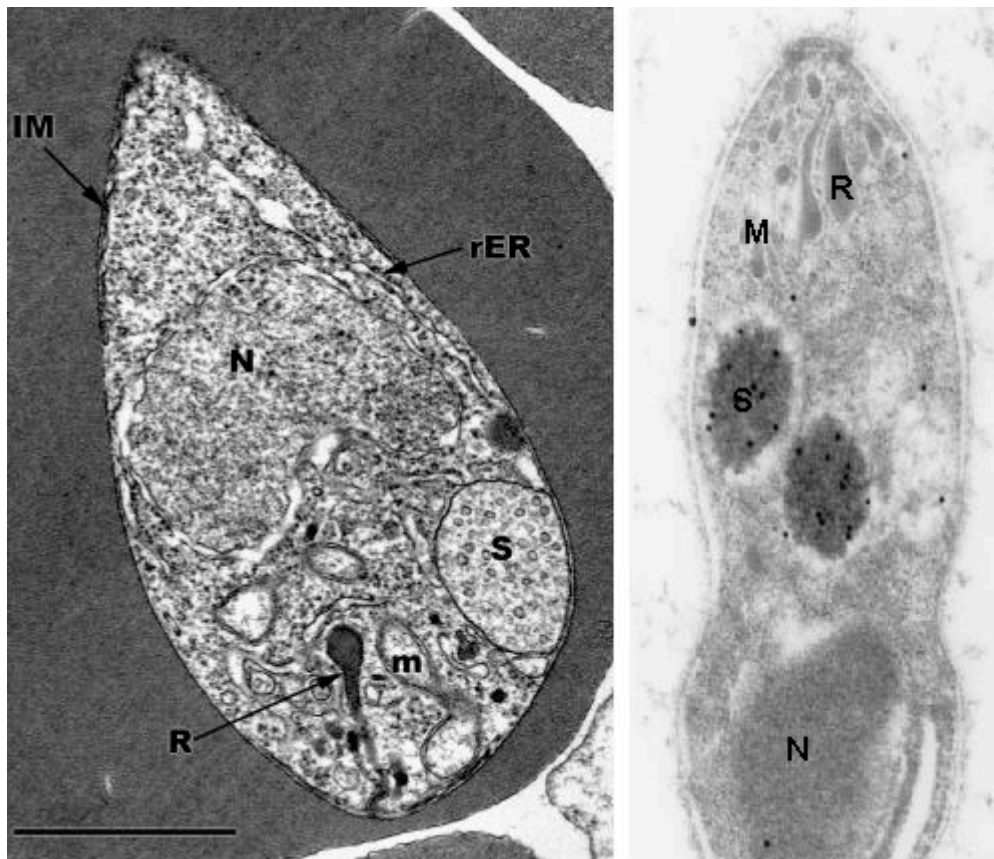


Figure 8 : Structure du mérozoïte de *Babesia sp.* et de *B. bovis* en microscopie électronique
(R : rhoptrie ; M : micronème ; S : Corps sphérique ; N : noyau)
(D'après Dowling et al. 1996; Lehtinen et al. 2008)

Le nombre, la taille et la forme des rhoptries varient selon les genres, les espèces et les stades parasitaires : forme sphérique de petite taille chez *Babesia* et *Theileria*, forme très allongée dans les sporozoïtes du *Plasmodium* et dans les zoïtes (sporozoïte et mérozoïte) de *T. gondii* (jusqu'à 2 μm de long). En général, les zoïtes de grande taille ont de nombreuses rhoptries allongées, leur taille et leur nombre étant probablement importants dans la création d'une vacuole parasitophore de taille appropriée lors de l'invasion (Blackman and Bannister, 2001).

Les rhoptries sont des organelles limitées par une membrane avec un contenu granuleux. En microscopie électronique, la membrane des rhoptries de *P. falciparum* a une structure typique de bicouche phospholipidique et contient de nombreuses particules intramembranaires de différentes tailles, correspondant à des protéines transmembranaires (Bannister et al., 2000). Quand elles déchargent leur contenu lors de l'invasion, les rhoptries changent d'apparence de façon spectaculaire : elles se vident, et diverses vésicules membranaires, tubes ou autres configurations apparaissent en leur sein (Nichols et al., 1983).

Les micronèmes

De façon similaire aux rhoptries, les micronèmes sont limités par une membrane avec un contenu dense et granuleux. En revanche, ils sont, comme leur nom l'indique, beaucoup plus petits, fusiformes ou sphériques et sont généralement en plus grand nombre. Dans les petits zoïtes comme les mérozoïtes de *P. falciparum*, ils sont généralement de petite taille et peu nombreux. Dans les mérozoïtes de *T. parva*, ils semblent même être totalement absents. Dans les zoïtes de grandes formes, comme les sporozoïtes de *Plasmodium* et les zoïtes de *Toxoplasma* et d'*Eimeria*, ils sont particulièrement nombreux, et sont capables de libérer de grandes quantités de protéines à la surface du parasite.

Les granules denses

Ce sont des vésicules délimitées également par une membrane, avec un contenu dense et granuleux. Le nombre, la taille et la forme varient selon le stade parasitaire et selon les espèces. Ils peuvent être facilement confondus sur les analyses de microscopie électronique avec des micronèmes ou des rhoptries en coupe transversale. Les structures appelées « corps sphériques » du mérozoïte de *Babesia* semblent appartenir à cette catégorie d'organelles.

B). Interactions mérozoïte-érythrocyte

i). Développement intra-érythrocytaire du mérozoïte

Le mérozoïte entré dans l'hématie perd rapidement sa forme allongée (Figure 9). D'aspect tout d'abord ponctiforme (Figure 9-1), il grossit et prend une forme arrondie appelée

trophozoïte (Figure 9-2) ou forme en anneau. Il perd tous les organelles caractéristiques de la forme infectante (rhoptries, micronèmes, corps sphériques). Le noyau ne subit pas de modifications avant le début de la division. La division se fait par bourgeonnement du cytoplasme (Figure 9-3) (Gorenflot et al., 1991). Les bourgeons grossissent au fur et à mesure que le cytoplasme du trophozoïte se réduit (Figure 9-4) et à partir de ce moment, le noyau se divise. Suite à la division binaire, deux nouveaux mérozoïtes allongés avec chacun leur complexe apical, dits formes géminées, sont obtenus (Figure 9-5). Pour *B. divergens*, l'angle entre les deux piroplasmes est très ouvert, d'où son nom d'espèce. Le temps de génération de *B. divergens* est variable selon la souche parasitaire testée et dure entre 8h30 et 13h00 en hématies ovines *in vitro* (Malandrin et al., 2004b).

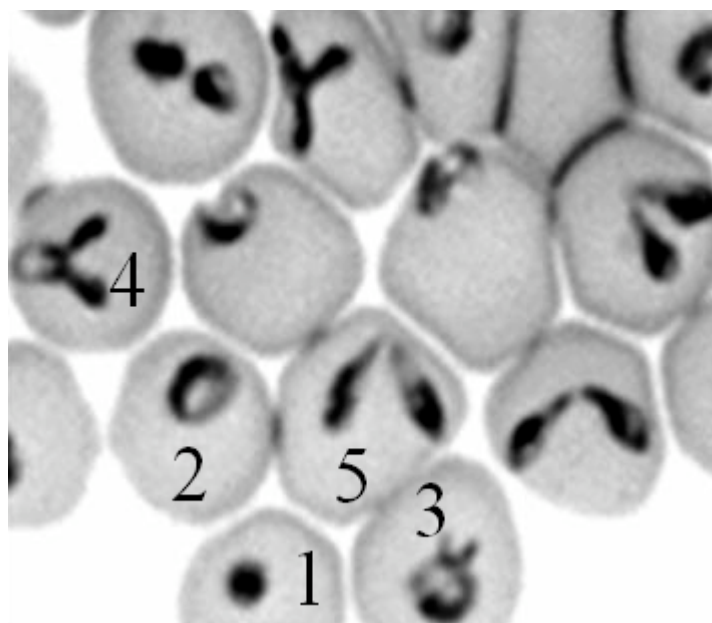


Figure 9 : Culture de *B. divergens* dans les globules rouges de mouton *in vitro* montrant les différents stades de développement intra-érythrocytaire du parasite

(Photo L. Malandrin)

N°1 : Trophozoïte jeune ; N°2 : Trophozoïte mature ; N°3 : Début de division cellulaire ; N°4 : Division cellulaire ; N°5 : Forme géminée

La taille des mérozoïtes de *B. divergens* ainsi que le nombre par hématie reflétant le nombre de division varie selon l'espèce animale infectée (tableau 1). La longueur varie de 1,5 à 2,66 μm , et 1 à 10 parasites peuvent être observés dans une hématie (Zintl et al., 2003).

Espèces d'hôte	Position dans l'érythrocyte	Dimensions	Polyparasitisme (nombre de parasite/GR)	Forme tétrade ^a
		Forme de poire : 1,5-1,91µm x		
Bovin	Périphérique	0,4-1.07µm ; Forme anneau : 1,48-1,8µm diamètre	Peu fréquent	<0,02
Humain	(Sub)centrale	Forme de poire : 1,9µm x 0,8µm	Commun : jusqu'au 8	<5
Chimpanzée	(Sub)centrale			
Singe Rhésus	Périphérique	Forme en anneau: 1-2µm	Commun ≥3	
Gerbille	(Sub)centrale	Forme de poire : 1,9-2,6µm x 0,8µm	Commun ≥ 9	Présent
Rat	(Sub)centrale	Forme de poire : 2,66 ± 0,65µm x 1,18 ± 0,43µm	Occasionel (5 à 6)	<5

Tableau 1 : Paramètres morphologiques de *Babesia divergens* infectant des globules rouges (GR) de différentes espèces animales

(D'après Zintl et al., 2003)

a. Pourcentage du stade tétrade dans tous les érythrocytes infectés

ii). Les étapes du processus d'invasion de *Babesia*

Les détails des mécanismes cellulaires et moléculaires ont surtout été étudiés chez *Plasmodium*, mais le déroulement général de l'invasion du GR par *Babesia* et notamment chez *B. bovis*, semble similaire (figure 10).

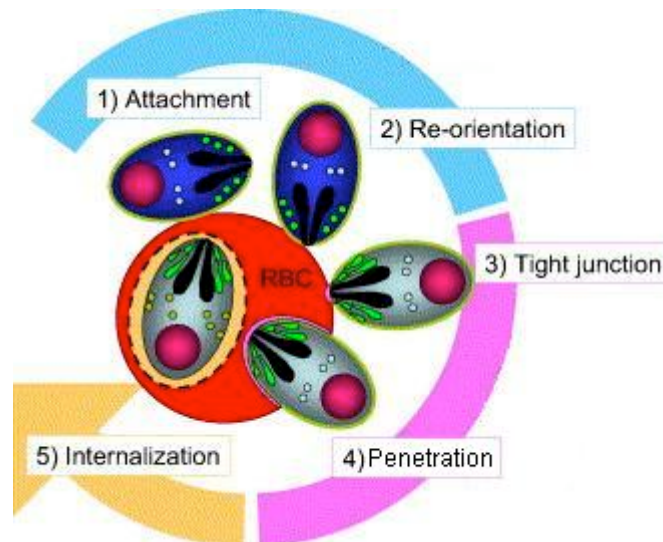


Figure 10 : Représentation schématique du processus d'invasion du globule rouge (GR) par *Babesia bovis*

(D'après Yokoyama et al., 2006)

1. Attachement du mérozoïte au GR ; 2. Réorientation du parasite ; 3. Fixation irréversible du mérozoïte au GR ; 4. Début de la pénétration, formation de la vacuole parasitophore ; 5. Fin de l'invagination et disparition de la vacuole parasitophore

L'invasion des GR par le mérozoïte est un processus actif et se réalise en cinq étapes, comme cela a été décrit chez *P. falciparum* (Sam-Yellowe, 1996; Preiser et al., 2000).

1-Attachement du mérozoïte à la membrane du GR

Lors du contact initial, le parasite s'attache aux érythrocytes de l'hôte. Cette phase d'adhésion est aléatoire, réversible et non spécifique. Ce sont des protéines du manteau qui sont mises en jeu.

2-Réorientation du parasite

Le parasite se réoriente afin de se retrouver perpendiculaire aux hématies. Le pôle apical est dirigé vers l'hématie et les organelles du complexe apical se retrouvent directement apposés à l'érythrocyte.

3-Fixation irréversible

Une jonction entre les membranes de GR et du mérozoïte est formée de façon irréversible. Cette jonction se déplace de l'avant vers l'arrière du parasite au fur et à mesure de sa pénétration par invagination.

4-Libération du contenu des organelles du complexe apical

Les organelles au pôle apical libèrent leur contenu dans l'invagination créée. Les canaux de

ces organelles fusionnent entre eux et avec la membrane plasmique ; les vésicules collapsent, libérant ainsi leurs molécules.

5-Pénétration du parasite

Le parasite pénètre dans le cytoplasme, entouré par une vacuole parasitophore créée par l'invagination de la membrane du globule rouge. Le parasite décharge ses propres molécules qui s'intègrent à la membrane. Le parasite se trouve finalement à l'intérieur du GR.

Dans le cas de *Babesia*, le processus d'invasion érythrocytaire global est similaire à celui décrit chez *Plasmodium*. Toutefois, les étapes finales varient au sein des membres du phylum des Apicomplexa. En particulier, la vacuole parasitophore dans les genres *Babesia* et *Theileria*, se désintègre rapidement après la pénétration et le parasite se retrouve alors libre dans le cytoplasme, contrairement au genre *Plasmodium*, chez lequel la vacuole parasitophore persiste jusqu'à la sortie du GR (Sam-Yellowe, 1996). Toutefois, la disparition de la vacuole parasitophore est parfois remise en question. En effet, cette caractéristique repose uniquement sur des données de microscopie électronique, méthode pour laquelle de nombreux artefacts peuvent être causés par les méthodes de fixation (Gohil et al., 2010).

iii). Rôles des organelles du complexe apical dans les processus d'invasion des érythrocytes

Durant le processus d'invasion, de la phase d'attachement à la formation de la vacuole parasitophore, les organelles du complexe apical sont fortement impliqués (Sam-Yellowe, 1996). L'invasion est un processus rapide qui est accompagné par une sécrétion des protéines des micronèmes, rhoptries et granules denses. Chez *Plasmodium*, une fois le mérozoïte fixé sur le globule rouge, le contenu des micronèmes et des rhoptries est sécrété et ces organelles s'atrophient (figure 11). L'implication des différents organelles du complexe apical dans le processus d'invasion n'est pas synchronisée : leurs contenus sont libérés à différents moments du processus et chaque molécule a un rôle précis et différent, permettant l'accomplissement des différentes étapes de l'invasion (Dubremetz et al., 1998).

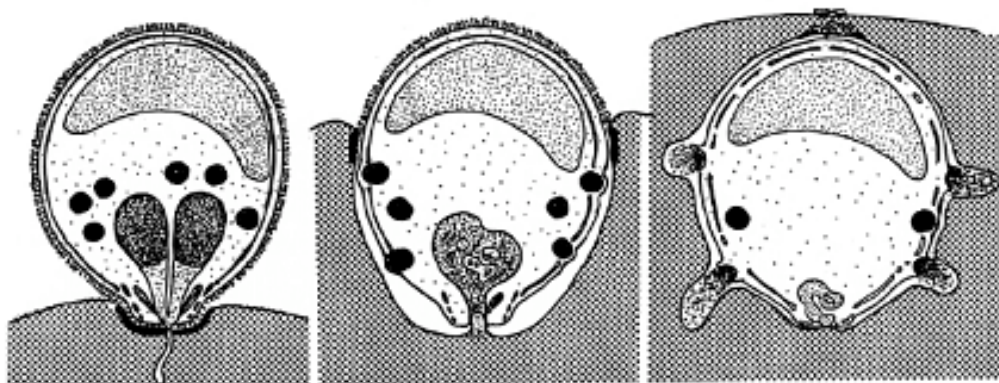


Figure 11. Sécrétion du contenu des organelles du complexe apical et invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte de *P. knowlesi*
(D'après Preiser et al., 2000)

Les rhoptries et micronèmes sécrètent leur contenu au niveau de l'apex du mérozoïte, tandis que les granules denses libèrent leur contenu sur toute la surface du zoïte (Perkins, 1992; Sam-Yellowe, 1996; Carruthers and Sibley, 1997; Lingelbach and Joiner, 1998; Preiser et al., 2000). Les sécrétions des micronèmes et des rhoptries semblent être généralement responsables de quatre interactions principales entre les zoïtes et leurs cellules hôtes: (1) la fixation sélective du zoïte à la membrane cellulaire, (2) le démantèlement de la structure de la membrane de la cellule hôte nécessaire à la formation de la vacuole parasitophore; (3) la transformation de la membrane plasmique des cellules hôtes en membrane de la vacuole parasitophore ; et (4) le lien entre les fibres d'actine et de myosine du parasite et la cellule hôte pour propulser le zoïte dans la vacuole parasitophore et /ou sur la surface de la cellule hôte (Blackman and Bannister, 2001).

Lorsque le mérozoïte est entré dans le GR, les granules denses (ou corps sphériques) se déplacent vers la surface du parasite et libèrent leur contenu par exocytose dans la vacuole parasitophore. Cela semble susciter un nouvel élargissement de la membrane de celle-ci.

Les mécanismes aboutissant à la formation de la vacuole parasitophore continuent à être un problème central non résolu du processus d'invasion. De toute évidence, les protéines de rhoptries de *P. falciparum* et *Toxoplasma* sont incorporées dans la membrane de la vacuole parasitophore (Sam-Yellowe et al., 1988; Beckers et al., 1994), et il a été prouvé que les lipides du mérozoïte sont insérés dans la membrane des globules rouges (Mikkelsen et al., 1988). La formation de la vacuole parasitophore et sa disparition sont des mécanismes encore inconnus

chez *Babesia*.

Si les mécanismes ne sont toujours pas élucidés chez les *Babesia*, les protéines impliquées dans ces divers processus sont, elles aussi, peu connues.

III. Description moléculaire et fonctionnelle des protéines impliquées dans le processus d'invasion

De nombreuses protéines ayant une fonction supposée ou certaine dans l'invasion érythrocytaire ont été étudiées de manière approfondie. Certaines d'entre elles sont situées à la surface du mérozoïte tandis que d'autres sont localisées dans les organelles du complexe apical (Yokoyama et al., 2006). Très peu de données existent pour *B. divergens*, en revanche, de nombreuses études ont été réalisées sur d'autres espèces de *Babesia* et sur des genres d'Apicomplexe proches, comme *Plasmodium* ou *Toxoplasma*. Les études comparatives entre *Plasmodium* et *Babesia* sont intéressantes du fait de leur proximité phylogénétique. Ainsi, certaines protéines ont été conservées au sein de l'évolution et ont un rôle similaire chez les deux parasites. Les comparaisons des séquences d'ADN de ces deux parasites permettent de retrouver chez l'un des protéines mises en évidence chez l'autre et d'en prédire leur fonction (Delbecq et al., 2003).

Les protéines impliquées dans le processus d'invasion ont été regroupées en plusieurs familles, selon leurs localisations cellulaires, leurs caractéristiques moléculaires ou leurs fonctions. D'un point de vue fonctionnel, elles peuvent être divisées en 3 catégories (Figure 12) : les protéines impliquées dans l'adhésion et la réorientation du parasite, celles impliquées dans la pénétration du mérozoïte dans le GR et celles impliquées dans l'internalisation et la formation de la vacuole parasitophore.

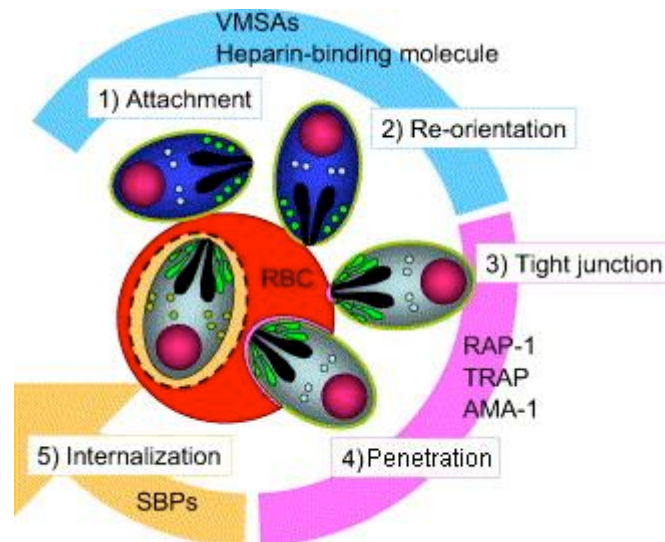


Figure 12 : Protéines impliquées dans le processus d'invasion des globules rouges par *B. bovis*
(D'après Yokoyama et al., 2006)

Les protéines de surface du mérozoïte seraient le souvent des protéines d'adhésion alors que les protéines des micronèmes et des rhoptries seraient des protéines intervenant dans la pénétration. Enfin, les protéines des granules denses ou des corps sphériques joueraient plutôt un rôle dans la phase d'internalisation (Dubremetz et al., 1998; Blackman and Bannister, 2001).

A). Protéines de surface du mérozoïte : rôle dans l'adhésion

Afin d'adhérer aux GR cibles, les mérozoïtes de *Babesia sp.* vont utiliser différentes molécules de surface, de façon similaire à *Plasmodium sp.* (Preiser et al., 2000). Les caractéristiques communes des protéines de surface du mérozoïte sont leur ancrage à la membrane du parasite par une ancre Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI), leur rôle probable dans l'attachement initial du mérozoïte au GR, leur immunodominance et leur extrême variabilité génétique. Chez *Babesia*, les protéines de surface du mérozoïte ou antigènes variables de la surface des mérozoïtes (VMSA : Variable Merozoite Surface Antigen) sont connues pour *B. bovis* (MSA-1 et MSA-2) (Hines et al., 1992; Jasmer et al., 1992; Suarez et al., 2000; Florin-Christensen et al., 2002), *B. bigemina* (gp45/gp55) (McElwain et al., 1987; McElwain et al., 1991; Fisher et al., 2001), *B. canis* (Bc28) (Carcy et al., 2005) et *B. divergens* (Bd37) (Carcy et al., 1995; Delbecq et al., 2002). Les données plus détaillées sur ces protéines seront développées pour *B. bovis* et *B. divergens*, en raison de l'avancée des connaissances pour

le premier, et de l'intérêt pour le travail de thèse pour le second.

Les VMSA sont des protéines exprimées non seulement à la surface des mérozoïtes mais aussi des sporozoïtes (Goff et al., 1988; Hines et al., 1989; Reduker et al., 1989; Palmer et al., 1991; Jasmer et al., 1992a; Mosqueda et al., 2002a; Wilkowsky et al., 2003). De ce fait, les VMSA sont supposées jouer un rôle essentiel dans la fixation initiale de ces 2 stades parasitaires sur les GR pendant la phase d'invasion. Cette hypothèse a été vérifiée par le fait que les anticorps spécifiques dirigés contre les membres de la famille VMSA inhibent l'invasion des GR bovins par les mérozoïtes et la fixation des sporozoïtes (Hines et al., 1992; Hines et al., 1995b; Suarez et al., 2000; Mosqueda et al., 2002a; Wilkowsky et al., 2003).

i). L'ancre glycosylphosphatidylinositol ou ancre GPI

Les GPIs sont des glycolipides que l'on retrouve dans tous types de cellules eucaryotes. Chez les parasites, ces GPIs sont abondants et pour une espèce de parasite donné, les GPIs sont très hétérogènes. Les GPIs contribuent à la pathogénicité en induisant la production de cytokines proinflammatoires, mais leur fonction principale est l'ancrage de protéines dans les bicouches lipidiques, soit au niveau de la surface cellulaire soit au niveau des organelles (Gowda et al., 1997; von Itzstein et al., 2008) (Figure 13). Chez les Apicomplexes, ces ancrages GPI permettent d'identifier les protéines de surface des mérozoïtes qui ont un rôle dans les interactions avec l'érythrocyte.

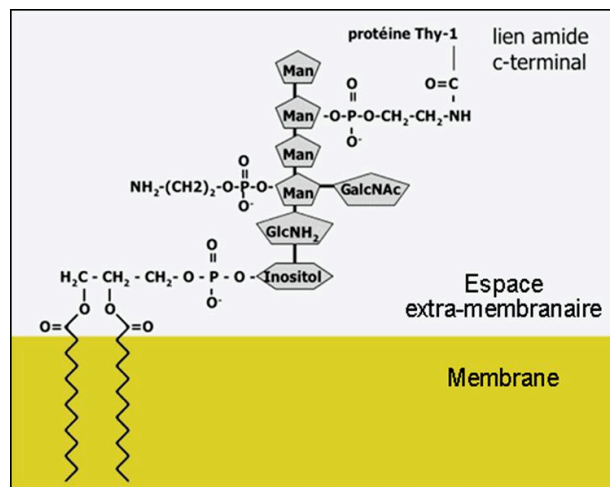


Figure 13. Structure de l'ancre Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)

(D'après Jasmer et al., 1992a)

ii) Les VMSA chez *B. bovis*

MSA-1 et MSA-2 sont deux antigènes de la famille VMSA décrits chez *B. bovis*. MSA-1 est codée par un gène présent en une seule copie (Mosqueda et al., 2002b). Elle est exprimée sur la surface du mérozoïte et du sporozoïte et induit la production d'anticorps qui bloquent l'invasion chez les animaux immunisés (Mosqueda et al., 2002a, b). L'organisation du second locus codant pour MSA-2 est plus complexe : il est constitué de 4 gènes appelés *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b* et *msa-2c*. Le nombre de gènes et leur ordre au locus *msa-2* varient selon la souche de *B. bovis* (Figure 14).

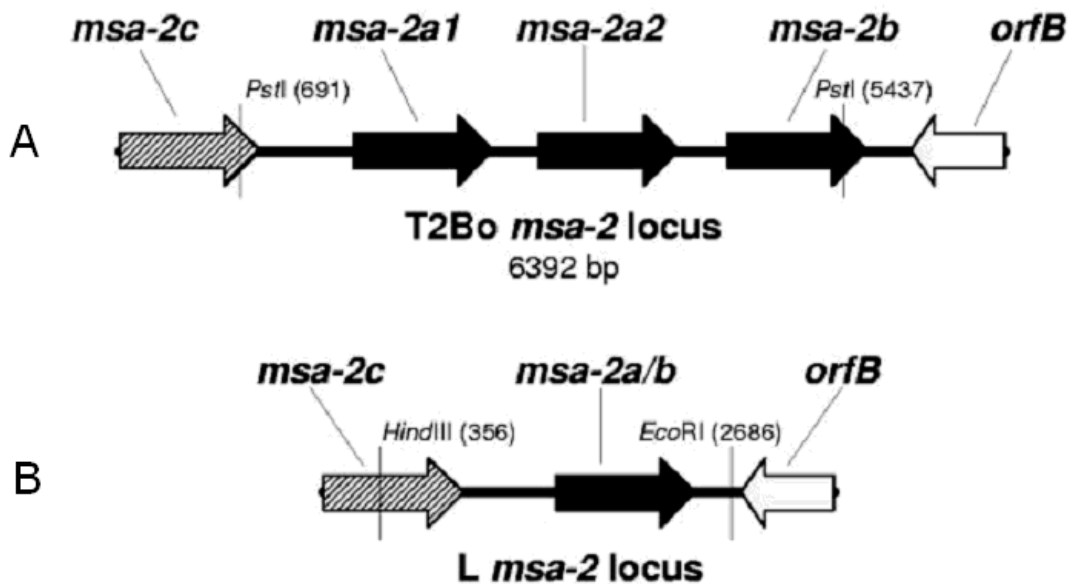


Figure 14 : Structure du locus de *msa-2* de deux isolats géographiquement éloignés de *B. bovis*

(D'après Berens et al., 2005)

A. Isolat T2Bo, south Texas, Amérique; B. Isolat L, New South Wales, Australie

Alors que l'ancre-GPI, la structure hydrophile centrale et la région transmembranaire sont des régions strictement conservées de MSA-2, la région de la protéine exposée à la surface est très polymorphe (Mosqueda et al., 2002a). De la même façon, les analyses comparatives de la séquence de MSA-1 entre les souches de *B. bovis* de régions géographiques diverses a montré que la partie N-terminale est relativement conservée, contrairement à la région C-terminale qui est hypervariable (Figure 15). La diversité de séquences de MSA entre souches de *B. bovis* se traduit par l'absence de réactivité croisée immunologique.

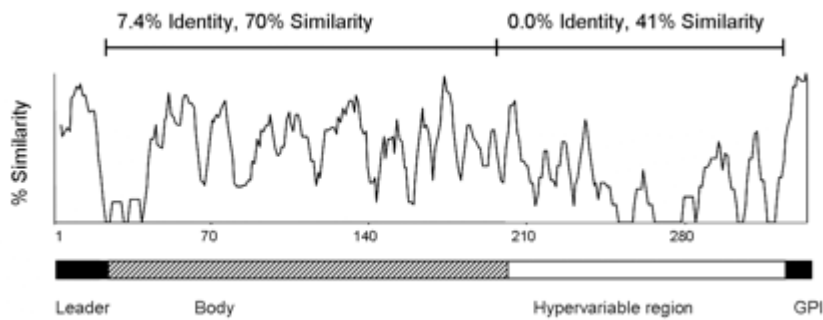


Figure 15 : Variation de la séquence en acides aminés de la protéine MSA-1 de 16 souches de *B. bovis* d'origines géographiques diverses
(D'après LeRoith et al., 2006)

Dans la région hypervariable (HVR), 4 motifs riches en proline peuvent être identifiés (Figure 16). Ces motifs sont exposés à la surface du parasite (LeRoith et al., 2006). Chez d'autres apicomplexes, par exemple *Plasmodium*, ses régions riches en proline ont été décrites comme étant impliquées dans la fixation et la pénétration du parasite dans la cellule hôte (Fang et al., 1991; Rich et al., 2000; Singh et al., 2003). MSA-1 a probablement la même fonction dans le processus d'invasion de l'érythrocyte par *B. bovis*.



Figure 16 : Structure de la région hypervariable de la protéine MSA-1 contenant des motifs dégénérés riches en proline (colorés sur la figure)
(D'après LeRoith et al., 2006)

Les 4 gènes sont co-exprimés à la surface non seulement d'un clone biologique mais d'un seul mérozoite, le transformant en une surface d'épitopes variables. Comme chacun d'entre eux est fonctionnel, comme le prouvent les essais d'inhibition d'invasion, ce mécanisme serait une méthode efficace d'échappement du système immunitaire (Florin-Christensen et al., 2002).

iii). Bd37 de *B. divergens*

Bd37 est une protéine de surface du mérozoïte, immunodominante, avec un ancrage GPI, qui se lie à la surface des érythrocytes.

La protéine Bd37 a tout d'abord été mise en évidence dans les surnageants de culture *in vitro* de *B. divergens* testés pour leur efficacité protectrice en vaccination (Gorenflot et al., 1990; Precigout et al., 1991; Valentin et al., 1993; Carcy et al., 1995; Grande et al., 1998). Bd37 est un antigène immunodominant de *B. divergens* (Gorenflot et al., 1990; Valentin et al., 1993; Carcy et al., 1995). En effet, il est reconnu précocement au cours d'infections naturelles ou expérimentales, avec une intensité importante et de façon persistante, quel que soit l'hôte infecté (Gorenflot et al., 1990; Moreau et al., 2009). C'est une protéine de 37 kDa, dont la présence en surface du mérozoïte a été démontrée, ainsi que son ancrage GPI et son clivage, libérant la protéine dans l'environnement (Grande et al., 1998; Delbecq et al., 2002; Precigout et al., 2004). La production d'une protéine recombinante rBd37 a permis de montrer qu'elle peut se lier à la surface des érythrocytes d'espèces hôte (GR humain, GR de gerbille et de bovin), mais aussi d'espèces non-hôtes (GR de chien). Une liaison non spécifique est suggérée, faisant intervenir des interactions électrostatiques entre des zones de la protéine chargées positivement et la surface membranaire du globule rouge chargée négativement (Delbecq et al., 2008).

Polymorphisme génétique de Bd37

La première séquence de *B. divergens* a été obtenue pour l'isolat Rouen 87 issu d'un cas de babésiose humaine. Elle a révélé la présence de deux séquences hydrophobes aux extrémités N- et C-terminales, qui correspondent respectivement à un peptide signal et à une ancre GPI (Delbecq et al., 2002). Quatre autres séquences ont ensuite été obtenues à partir d'isolats d'origine bovine française ou étrangère (Precigout et al., 2004; Hadj-Kaddour et al., 2007). A partir de leurs alignements, une identité en acides aminés entre 53.5% et 88% est obtenue entre ces isolats (Precigout et al., 2004; Carcy et al., 2005; Hadj-Kaddour et al., 2007). Une région très polymorphe caractérisée par des insertions/délétions est présente en N-terminal entre les acides aminés 26 et 80 et est responsable des variations de taille observées entre ces protéines (35 à 37 kDa) (Figure 17).

```

1705B      1 MKTSKILNTAAVCLLTIFFRGGQSVSCDPNLACTSSQPAGSSAQS-P-SEAAKGT---AEQ
Y5         1 MKTSKILNTAAICLLAMGFNGNNVSC-AHLSGH--OET-AAANSQD-S-TTRND---AQQ
W8843     1 MKTSKILNTAAICLLAMGFNGNNVRC-TNLSGA--QQP-AASTPGV-S-TSGND---SQQ
Rouen 87  1 MKTSKILNTAAICLLAMGFNGNNVSC-TNLSGS--OEP-AAANPVV-S-TPGND---AQQ
6303E     1 MKTSKILNTAAVCLLAIGFRGGQSVVIC-NNLNGS--QDQ-ATNNSGVAS-ATHTDVPPVQQ

1705B     56 A---PSC-----EVQOT--P-EQ----TPVKA VVKSLLEDLREELKGORETFLSKLIES
Y5        52 -----Sc-----EVQOT--P-QQ----TPVKA VVKSLLEDLREELKGORETFLSKLIES
W8843     52 -----GITS---E-QQ---P-QQAAGETPAKV VVKTLDELRCGLRGQREAFLEI IKS
Rouen 87  52 AGTQQGCANSKSVPE-QQ---E-QQAAGETPAKV VVKTLDELRCGLRGQREAFLEI IKS
6303E     56 -----cV-----A-QPATLPEQQAADFAIAK-VVKTLEDITREELKGORETFLSEI IKS

1705B     99 DGAFGFLQLIDELRVIDTDL LLLKVDGTKVKAQVVKVAYLESIGIKGGSVVEECLDNLMTK
Y5        93 DGAFGFLQLIDELRVIDTDL LLLKVDGTKVKAQVVKVAYLESIGIKGGSVVEECLDNLMTK
W8843     97 DGPFTILQLVGYLRVIDTDL LLLKVDSTKVDEAGKKVKAYLEKIGIRGDSVEEAALDNLMIK
Rouen87   107 DGPFTILQLVGYLRVIDTDL LLLKVDSTKVDEAGKKVKAYLEKIGIRGDSVEEAALDNLMIK
6303E     102 NDAFTILQLVGYLRVIDTDL LLLNVDSAKVDEAGKKVKAYLKSIGIMDEKVEEGLVNLMTK

1705B     159 VSAITRGTVEGSAQSTDSEDLK TLLLKFSSEDLKAEQERHGDKDESK--E-LLKNWGVORD
Y5        153 VSAITRGTVEGSAQSTDSEDLK TLLLKFSSEDLKAEQERHGDKDESK--E-LLKNLGVORD
W8843     157 IYELTNGTVESSPOGTDSEELK TLLLKFRIDLAEQELHS---EARGGEALLSSMKIQHD
Rouen87   167 VYEITRGTVESSAQSTDSEELK TLLLKFSSEDLKAEQELHS---EARGGEALLSSMKIQHD
6303E     162 VVKLTRGTVEGSTQSTDSEELK TLLLKFSSEDLKAEQERHSDKDESK--D-LLNLSVERD

1705B     216 ELVKKFTEMSPSFLTSEDISGFL TVPEYGFMDAAMWKKVEKKISDKLESSDITDELKTL
Y5        210 ELVKKFTEMSPSFLTSEDISGFL TVPEYGFMDAAMWKKVEKKISDKLESSDITDLKTL
W8843     214 ELLKKFAALNPTFLSTEDISGFL TVPEYGAPMNAKWKKVECKINEKLESSEIQGDLLKAL
Rouen87   224 ELLKKFAALTPFLSTEDISGFL TVPEYGAPMNAKWKKVEGMHCKLESSEVPANLKAL
6303E     219 EFVKKFTEANPSFLTDDISAFL TVPNYGSTNDHCKWKTVERKIKDKVESRDITTELKTL

1705B     276 LAKLI---EQREQMMDLLYGPIGH HDCAAGSGQGSSPKKPSFAAVPSSLCAIVFGIIVSMF
Y5        270 LAKLI---EQREQMMDLLYGPIGH EDCAARSGQGSCKPKKPSFAAVPSSLCAIVFGIIVSMF
W8843     274 VAELIKLRQREQMMDLLYGPIGH HDCAAGSGQGSSPKKPSFAAVPSSLCAIVFGIIVSMF
Rouen87   284 VAELIELRQREQMMDLLYGPIGH HDCAAGSGQGSSPKKPSFAAVPSSLCAIVFGIIVSMF
6303E     279 IGELI---VQRENMMMDLLYGPIGH HDCAA---GSSPKKPSFAAVPSSLCAIVFGIIVSMF

```

Figure 17. Alignement de séquences de Bd37 obtenues à partir de différents isolats de *B. divergens*

(D'après Hadj-Kaddour et al., 2007)

Les acides aminés dont le fond est noir correspondent à ceux qui sont identiques dans au moins 3 séquences sur 5 et les acides aminés dont le fond est gris correspondent à ceux qui sont similaires mais pas identiques

Par PCR-RFLP sur un plus grand nombre d'isolats, ce polymorphisme a été confirmé : 5 haplotypes de *Bd37* ont pu être mis en évidence parmi 14 souches testées (Hadj-Kaddour et al., 2007) (Figure 18).

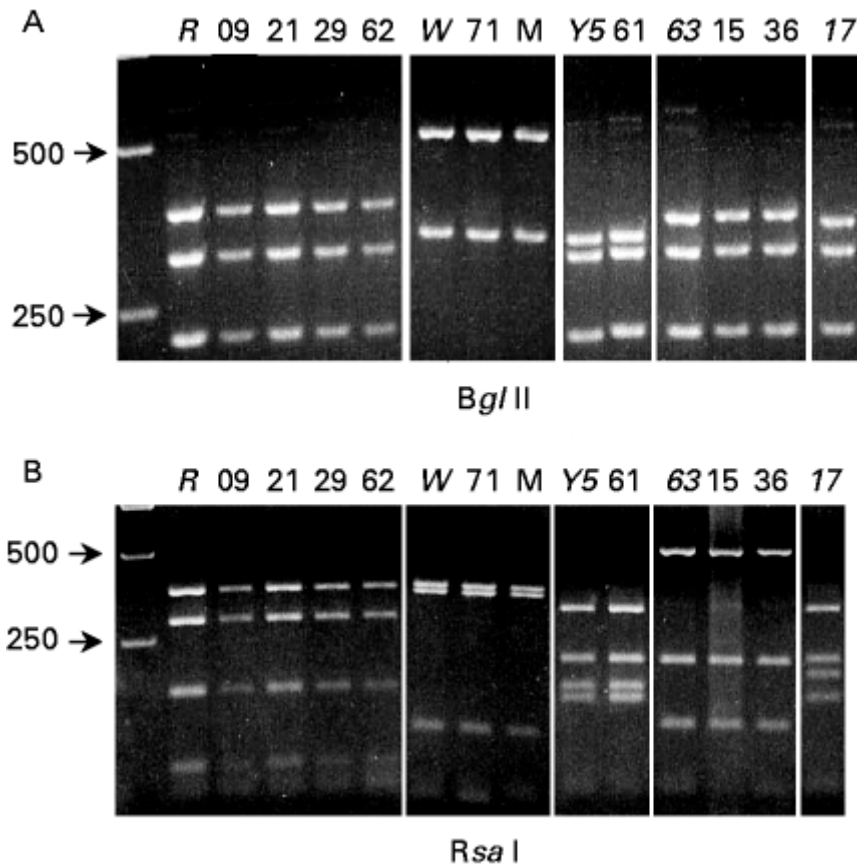


Figure 18 : Identification chez *B. divergens* de 5 haplotypes de *Bd37* par PCR-RFLP pour 14 isolats de *B. divergens*
(D'après Hadj-Kaddour et al., 2007)

Bd37 est membre d'une famille multigénique

Lors des premières analyses effectuées sur *Bd37* par Southern blot, un seul transcrit de 1,3 kb a été détecté, faisant suspecter aux auteurs qu'une seule copie de ce gène était présente (Delbecq et al., 2002). Récemment, pour la souche Rouen 87, un gène codant une protéine Bd37-related (Bd37N) possédant des peptides hydrophobes dans les régions N- et C-terminales similaires à Bd37 mais avec seulement 48% des acides aminés identiques, a été cloné (Carcy et al., 2005). Par Southern Blot, des sondes dérivées des gènes *Bd37* et *Bd37N* s'hybrident sur des fragments génomiques différents, montrant que ce sont 2 gènes différents (Carcy et al., 2005). En outre, la reconnaissance d'un triplet de protéines Bd37-like de la souche de *B. divergens* Munich 87 par les sérums de 10 gerbilles immunisées suggérait également que la protéine Bd37 pouvait être codée par une famille multigénique constituée par au moins deux gènes liés mais distincts génétiquement (Carcy et al., 1995).

Bd37 candidat vaccin

L'intérêt de Bd37 en tant que candidat vaccin a été le moteur des recherches effectuées sur cette protéine (Valentin et al., 1993; Carcy et al., 1995). La protection des gerbilles suite à l'injection d'anticorps monoclonal anti-Bd37 (de la souche Rouen 87) est variable contre les infections réalisées avec des souches hétérologues (protection de 100% vis à vis de la souche W8843 et de 0% vis à vis de la souche 6303E) et s'explique par le polymorphisme génétique existant (Precigout et al., 2004). Plus récemment, une amélioration de la formulation du vaccin incluant les séquences N- et C-terminales hydrophobes et l'utilisation de protéines recombinantes représentatives du polymorphisme de la protéine a permis une protection des gerbilles vaccinées contre des infections challenges homologues ou hétérologues (Delbecq et al., 2006; Hadj-Kaddour et al., 2007). L'effet protecteur reste à démontrer chez l'hôte naturel, le bovin.

B). Protéines de pénétration

De l'étape d'attachement sur le GR à leur internalisation complète, les parasites apicomplexes sécrètent des protéines de leurs complexes apicaux au niveau de la membrane du mérozoïte ou dans l'environnement extérieur des parasites (Sam-Yellowe, 1996; Preiser et al., 2000). Les protéines sécrétées par les rhoptries et les micronèmes semblent jouer un rôle central dans la pénétration des cellules par les parasites apicomplexes (Carruthers et al., 1999; Soldati et al., 2001; Tomley et al., 2001)

i). Les protéines de micronèmes

Ces protéines sont relarguées dans les secondes qui suivent le contact avec la surface de l'érythrocyte. Elles ont un rôle dans l'attachement et après sécrétion, elles sont transportées vers le pôle postérieur du mérozoïte et décapées (Kats et al., 2008).

Apical membrane antigen-1 (AMA-1)

La protéine AMA-1 a été identifiée et séquencée chez de nombreux Apicomplexes tels que *P. falciparum*, *T. gondii* et est fortement conservée dans ce phylum (Chesne-Seck et al., 2005). Elle a été mise en évidence également chez plusieurs espèces de *Babesia* : *B. bovis* (Gaffar et al., 2004), *B. gibsoni* (Zhou et al., 2006b) et *B. divergens* (Montero et al., 2009).

La protéine AMA-1 de *P. falciparum* (PfAMA-1) est une protéine de micronème de 83 kDa exprimée dès le stade schizonte à la fin du cycle asexué du parasite, et sécrétée à la surface du mérozoïte extra-cellulaire (Narum and Thomas, 1994; Howell et al., 2003). Elle a trois caractéristiques structurales : un ectodomaine N-terminal riche en cystéine, un domaine transmembranaire et une queue C-terminale intracytoplasmique (Gaffar et al., 2004). Elle subit un certain nombre de clivages avec tout d'abord élimination du domaine N-terminal pour avoir alors un poids moléculaire de 66kDa en surface du mérozoïte. Durant l'invasion du mérozoïte, PfAMA-1 est de nouveau clivée en fragments solubles de 44 et 48kDa (Howell et al., 2001). L'implication de la protéase subtilisin-like PfSUB2 dans ce clivage est suspectée (Withers-Martinez et al., 2004). Le rôle de AMA-1 dans l'invasion a été montré de façon indirecte : des souris ont été protégées contre l'infection par *P. chabaudi* par des anticorps anti-AMA-1 (Anders et al., 1998) ; de même l'invasion de GR par *P. reichenowi* et *P. vivax* est inhibée par des anticorps anti-AMA-1 (Kocken et al., 1999; Kocken et al., 2000). Il est postulé que la portion intracytoplasmique d'AMA-1 pourrait se lier à d'autres protéines intracellulaires et diriger le rythme de la sécrétion asynchrone des différentes protéines de micronèmes (Healer et al., 2005).

Bien que la similitude entre AMA-1 de *B. bovis* (BbAMA-1) et PfAMA-1 soit faible, on retrouve les caractéristiques structurales (Gaffar et al., 2004). L'étude de l'AMA-1 de *B. gibsoni* a montré des caractéristiques identiques à BbAMA-1 (les peptides signaux ; les cystéines conservées ; une queue courte cytoplasmique), ce qui indique l'existence de fonctions similaires dans l'adhésion de protéines ou récepteurs carbohydre entre les espèces (Zhou et al., 2006b). Bien que la fonction biologique de BbAMA-1 ne soit pas prouvée, sa localisation subcellulaire, son expression stade-spécifique et sa sécrétion pendant l'invasion de la cellule d'hôte suggèrent qu'elle est impliquée dans le processus d'invasion des hématies. Elle serait en partie responsable de la réorientation du mérozoïte à la surface du GR (Gaffar et al., 2004).

Chez *B. divergens*, AMA-1 est codé par un gène de 1.8kb présent en une seule copie (Montero et al., 2009). C'est une protéine de 606 acides aminés ayant une masse moléculaire estimée à 68kDa d'après la séquence du gène. Elle possède une similarité avec AMA-1 des autres apicomplexes, en particulier avec celle de *B. bovis* avec une identité de 51 % et avec celle de *P. falciparum* avec une identité de 30% (Montero et al., 2009). Comme PfAMA-1 et BbAMA-1, BdAMA-1 est sécrétée vers la membrane du mérozoïte après clivage, et se trouve dans le surnageant de culture in vitro avec un poids moléculaire inférieur (75kDa avant clivage et 48kDa, 44kDa après clivage). BdAMA1 est localisée à l'extrémité apicale des parasites intracellulaires, puis à la surface des mérozoïtes. Les anticorps anti-BdAMA1 inhibent l'invasion érythrocytaire de façon spectaculaire. L'accumulation de BdAMA1 à la jonction du point de contact du parasite et de GR suggère notamment sa fonction dans la phase de fixation du parasite au globule rouge (Montero et al., 2009).

Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP)

La protéine TRAP a été décrite principalement chez les parasites du genre *Plasmodium*. Elle est présente dans les micronèmes des mérozoïtes mais aussi des sporozoïtes. Au cours du processus d'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes, TRAP est libérée à la surface de la cellule, au niveau du pôle apical en contact avec la cellule hôte puis est envoyée vers le pôle postérieur le long de la surface du sporozoïte au fur et à mesure de sa pénétration. Son rôle essentiel est d'assurer la mobilité du parasite en interagissant avec les filaments d'actine et de myosine via son domaine intracytoplasmique et la liaison aux hépatocytes via sa portion extracellulaire (Menard, 2000). Ce sont des protéines transmembranaires caractérisées par une portion extracellulaire composée d'un ou de plusieurs domaines TSR (thrombospondin type I-repeat) et vWF-like A (von Willebrand factor), par une partie transmembranaire avec un site de clivage sensible à la protéase rhomboïde et par un domaine intracellulaire avec un résidu tryptophane en position sub-terminale (Morahan et al., 2009). L'importance fonctionnelle de TRAP durant le processus d'invasion par le sporozoïte a été établie, la mobilité du sporozoïte, l'invasion de la glande salivaire et l'infectiosité du sporozoïte étant diminuées par interruption de la fonction du gène TRAP par mutation ou recombinaison homologue (Sultan et al., 1997;

Wengelnik et al., 1999). Grâce à ces rôles essentiels, TRAP est devenu une protéine d'intérêt pour la vaccination contre la malaria (Sultan et al., 1997).

Des homologues de TRAP ont été identifiés chez deux espèces de *Babesia*, *B. bovis* (Gaffar et al., 2004) et *B. gibsoni* (Zhou et al., 2006a). Chez ces deux espèces de *Babesia*, TRAP a également été identifiée comme étant une protéine transmembranaire contenant des domaines vWF-like A et TSR-1, une région transmembranaire et une région C-terminale intracytoplasmique (Gaffar et al., 2004; Zhou et al., 2006a). Les analyses avec des anticorps anti-BbTRAP ont montré que BbTRAP était essentiellement localisée au niveau apical du mérozoïte. Les anticorps spécifiques inhibent l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *B. bovis* (Gaffar et al., 2004). La localisation de TRAP chez *B. gibsoni* (BgTRAP) au niveau des micronèmes et l'inhibition de la croissance de *B. gibsoni* a été observée avec un antiserum contre BgTRAP recombinante. TRAP chez ces deux espèces pourrait donc jouer un rôle important dans l'invasion du mérozoïte (Gaffar et al., 2004; Zhou et al., 2006a).

ii). Les protéines de rhoptries

RAP-1

Le contenu des rhoptries est sécrété immédiatement après l'adhésion du parasite à la surface du globule rouge, après celui des micronèmes. Le phénomène d'exocytose requiert apparemment un contact étroit entre le pôle apical du parasite et la membrane du globule rouge. De nombreuses protéines ont été identifiées et semblent impliquées soit dans la création de la jonction mobile entre le parasite et l'érythrocyte, soit dans la mise en place de la vacuole parasitophore. Elles sont localisées soit dans le bulbe, soit dans le canal de la rhoptrie avec une sécrétion différentielle selon leur localisation (Kats et al., 2008).

Chez *Plasmodium*, les familles de protéines de rhoptrie décrites actuellement et qui pourraient jouer un rôle important dans l'interaction GR-mérozoïte sont les suivantes: la famille «reticulocyte-binding-like » (RBL) (DeSimone et al., 2009), et «normocyte binding proteins» (NBP-1,-2a, 2b-, -3, -4), également appelé «reticulocyte binding protein homologues» RBP-1 et 2 (Galinski et al., 2000), la famille RAP-1, -2, et-3 (Howard et al., 1998) et Rhop-H1/CLAG, Rhop-H2, et Rhop-H3 (Sam-Yellowe et al., 1995), la famille « rhoptry associated membrane

antigen » (RAMA) MAEBL (Noe and Adams, 1998). Seule RAP-1, pour laquelle des données existent chez *Babesia*, sera détaillée.

RAP-1, initialement décrite chez *B. bovis* et *B. bigemina*, est présente chez toutes les espèces de *Babesia* étudiées (*B. gibsoni*, *B. caballi*, *B. ovis*, *B. canis*, et *B. divergens*) avec une forte homologie de séquence entre elles (Suarez et al., 1991a; Dalrymple, 1993; Dalrymple et al., 1993; Skuce et al., 1996; Zhou et al., 2007; Terkawi et al., 2009; Bhoora et al., 2010). RAP-1 fait partie d'une famille multigénique : 2 copies chez *B. bovis* et *B. canis*, 4 copies chez *B. bigemina*, 5 copies chez *B. ovis*, 3 copies chez *B. gibsoni*. Les caractéristiques moléculaires définissant la famille RAP-1 de *Babesia* comprennent la présence d'un peptide signal, de quatre cystéines conservées, d'un motif conservé de 14 acides aminés et de plusieurs motifs plus courts également conservés dans les 300 premiers acides aminés (Suarez et al., 1991a). La portion C-terminale de la protéine est beaucoup plus variable. La structure secondaire de la protéine est très conservée parmi les différents isolats (Suarez et al., 1991a; Suarez et al., 1993; Suarez et al., 1994; Brown et al., 1996).

RAP-1 chez *B. bovis*

Chez *B. bovis*, une protéine de 60 kDa de rhoptrie, désignée BbRAP-1, a été identifiée (Suarez et al., 1991b; Dalrymple et al., 1993; Sam-Yellowe, 1996). Elle est codée par deux gènes disposés en tandem. Ces 2 gènes sont identiques entre eux chez certaines souches et de toute façon très conservés selon les souches et au sein d'une souche donnée (taux de mutation de 0,85%) (Suarez et al., 1998) (Figure 19).

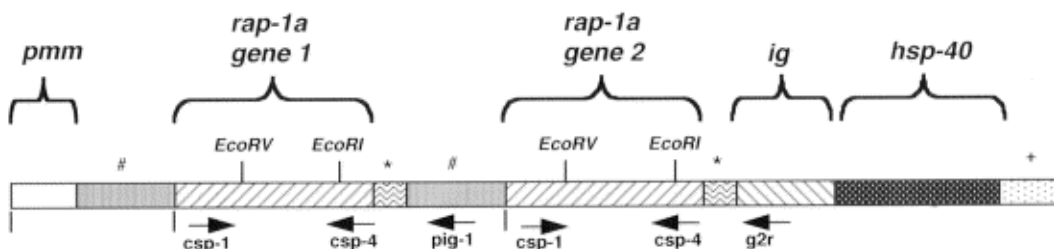


Figure 19 : Structure de locus *rap-1* de *B. bovis* (isolat Mo7)

(D'après Suarez et al., 1998)

RAP-1 est localisée au niveau apical dans le mérozoïte de *B. bovis* (Goff et al., 1988; Reduker et al., 1989; Palmer et al., 1991; Dalrymple et al., 1993) et il a été montré par microscopie électronique qu'elle est clairement détectable au niveau des rhoptries (Suarez et al., 1993). BbRAP-1 est présente chez tous les stades de développement des parasites intracellulaires (trophozoïte et les formes de division suivantes) et chez les mérozoïtes extracellulaire (Yokoyama et al., 2002). Elle est aussi détectée chez les sporozoïtes, formes parasitaires injectés par la tique qui pénètrent également dans les globules rouges (Mosqueda et al., 2002b). Les anticorps anti-BbRAP-1 inhibent la prolifération de *B. bovis* en culture (Yokoyama et al., 2002) et l'attachement des sporozoïtes à la surface des GR (Mosqueda et al., 2002b). Ces résultats indiquent que BbRAP-1 a une fonction essentielle dans l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes et les sporozoïtes.

RAP-1 de *B. bigemina*

Le locus *rap-1* de *B. bigemina* est d'une très grande complexité : il contient cinq copies de gène *rap-1a* disposées en tandem séparés chacun par des régions intergéniques (IG), dont chacune contient une copie identique d'un gène lié désigné *rap-1b*. Une copie supplémentaire du *rap-1b* et un autre gène désigné *rap-1c* sont présents à l'extrémité 3' du locus (figure 20) (Suarez et al., 2003). Cela fait donc au total 11 gènes *rap-1*. De plus, l'arrangement de ces gènes est variable selon les souches (Hotzel et al., 1997)

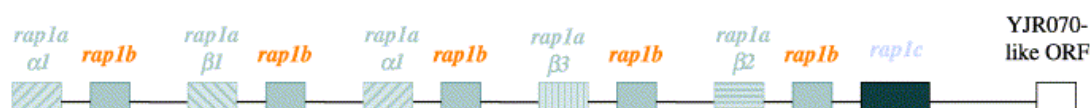


Figure 20 : Structure du locus *rap-1* de *B. bigemina* (isolat JG-29)
(D'après Suarez et al., 2003)

Les gènes *rap-1b* et *rap-1c* font partie de classes assez différentes de *rap-1a*, qui lui se rapproche des gènes *rap-1* identifiés chez les autres espèces de *Babesia* (Suarez et al., 2003). La conservation de la séquence de RAP-1b et RAP-1c chez différentes souches de *B. bigemina* est très élevée (taux de mutation inférieur à 1,5%). Chaque gène *rap-1a* présente un dimorphisme et résulte de la combinaison de variants (2 à 3 variants). La fonction de tous ces gènes n'est pas connue, mais si *rap-1a* est transcrit puis exprimé dans les rhoptries, les transcrits de *rap-1b* et

rap-1c sont beaucoup moins abondants et leur expression n'est pas détectable. Il semble donc exister au niveau du locus *rap-1* de *B. bigemina* une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Suarez et al., 2003).

RAP-1 chez *B. divergens*

Un homologue potentiel de RAP-1 a été cloné chez *B. divergens*, codé par un gène de 1.4kb. La protéine décrite comprend 408 acides aminés avec une masse moléculaire estimée à 46kDa (Skuce et al., 1996). Comme pour toutes les autres RAP-1, elle semble faire partie d'une famille multigénique qui comporterait au moins 3 membres appartenant à deux classes de gènes différentes (Dalrymple et al., 1996). Aucune information supplémentaire confirmant sa localisation dans les rhoptries ou sa fonction ne sont disponibles.

iii). Les protéines des corps sphériques (granules denses)

SBP-1 à 3 (Spherical Bodies Proteins)

Contrairement à la sécrétion du contenu des rhoptries et des micronèmes, celle du contenu des granules denses se fait par fusion de leur membrane avec la membrane plasmique du parasite. Elle n'est donc pas localisée à l'apex du parasite. Le rôle principal des protéines de ces organelles serait de participer à la formation d'une vacuole parasitophore fonctionnelle dans le but de rendre l'environnement cellulaire optimal pour la survie des parasites. Elles seraient impliquées dans la croissance et la viabilité intracellulaire du parasite (Ruef et al., 2000; Bannister and Mitchell, 2003).

Jusqu'à présent, trois protéines, SBP-1 (77-80 kDa) (Hines et al., 1995a), SBP-2 (225 kDa) (Jasmer et al., 1992b; Dowling et al., 1996), et SBP-3 (135 kDa) (Ruef et al., 2000), ont été identifiées dans les corps sphériques de *B. bovis*. Ces protéines ont des peptides signaux putatifs au niveau de la région N-terminale. Elles sont libérées au niveau de la face cytoplasmique de la membrane du GR infecté au cours de l'invasion (Hines et al., 1995a; Dowling et al., 1996; Ruef et al., 2000). Il a été montré que le contenu des corps sphériques serait impliqué plus spécifiquement chez les *Babesia* dans la dissolution de la membrane de la vacuole parasitophore (Yokoyama et al., 2006). Aucun homologue n'a été mis en évidence parmi les protéines des

granules denses des autres Apicomplexes, ce qui indiquerait bien la nature assez particulière de leur fonction chez *Babesia* (Ruef et al., 2000).

iv). Protéases

Les protéases des parasites jouent un rôle dans de multiples processus métaboliques et notamment le processus d'invasion. Différents types de protéases peuvent être exprimés chez les différents stades du cycle de vie du parasite permettant la réplication du parasite et sa métamorphose (Barrett and McDonald, 1986). Les parasites intracellulaires exprimeraient des protéases à des niveaux d'activité élevés afin de dégrader efficacement les protéines de l'hôte. Les protéases libérées par le parasite pourraient également endommager les cellules et les tissus de l'hôte et permettre l'invasion du parasite.

Les protéases de *Plasmodium* sont nécessaires pendant l'invasion et la rupture des érythrocytes. Une accumulation de protéines de surface a été observée lors de l'inhibition de l'activité d'une sérine protéase subtilisine-like (PfSUB1), et par conséquent, l'invasion érythrocytaire a été diminuée. Cette protéase participerait à la maturation protéolytique de certains antigènes de surface du mérozoïte de *P. falciparum* (MSP1, MSP6 et MSP7) (Koussis et al., 2009). Une sérine subtilisine-like PfSUB2 a été démontrée comme étant responsable d'une activité sheddase permettant d'activer les ligands parasitaires se liant aux récepteurs du GR (Harris et al., 2005). Ces protéases matures se trouvent dans les granules denses du mérozoïte, et elles sont sécrétées sous une forme soluble au moment de l'invasion des érythrocytes (Blackman et al., 1998).

Récemment, une sérine subtilisine-like a été identifiée chez *B. divergens* avec une forte conservation du site actif des Apicomplexa, appelée BdSUB1. Elle est la première protéase caractérisée chez les espèces de *Babesia*. La protéase mature est localisée au niveau de corps sphériques du mérozoïte, et subit une étape d'activation. Le rôle essentiel de cette protéase dans l'invasion a été mis en évidence par le test d'inhibition de croissance avec des inhibiteurs de protéases : les protéases sont cruciales pour l'assemblage et le trafic des protéines des organelles (Montero et al., 2007).

Publications

Article N° 1 : Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): Isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens* (Redescription de *Babesia capreoli* (Enigk et Friedhoff, 1962), chez le chevreuil (*Capreolus capreolus*): Isolement, culture, spécificité d'hôte, caractérisation moléculaire et critères de différenciation avec *Babesia divergens*)

Article publié dans International Journal for Parasitology (2010), 40, 277-284

L'utilisation récente des outils moléculaires seuls pour la caractérisation des *Babesia* infectant les cervidés a conduit à la confusion entre *Babesia divergens* et *Babesia capreoli*, et abouti à leur regroupement sous la dénomination «*B. divergens*-like». Afin de clarifier cette confusion taxonomique, des isollements de *Babesia* à partir de sang de chevreuil et de bovin ont été réalisés, et les caractéristiques biologiques et moléculaires des différents isolats ont été analysées.

Sur ces bases, nous concluons que:

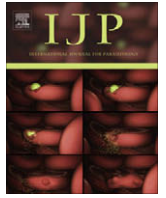
- (i) les parasites isolés du sang de chevreuils appartiennent à l'espèce *B. capreoli*,
- (ii) il n'y a pas de variations intraspécifiques de l'ADNr 18S pour les espèces *B. capreoli* et *B. divergens*,
- (iii) ces deux espèces sont très proches morphologiquement, sérologiquement et moléculairement (99,83% d'identité dans leur ADNr 18S),
- (iv) ces deux espèces sont différenciables par leurs capacités à se développer in vitro dans les érythrocytes bovins, ovins et humains, par leur pouvoir pathogène sur gerbilles, et par une différence de trois bases aux positions 631, 663 et 1637 de l'ADNr 18S très conservé,
- (v) *B. capreoli* ne constitue pas une menace pour l'Homme ou le bétail.

Une description détaillée de la gamme d'hôtes, de la répartition géographique, de la caractérisation biologique et moléculaire de *B. capreoli*, est apportée. Des lignées clonales de référence ont été déposées au Muséum d'Histoire Naturelle de Paris.

Dans cette première partie de mon travail, j'ai validé la différenciation des espèces *B. divergens* et *B. capreoli* sur la base des séquences de l'ARNr18S, et montré l'absence de

variations intra-spécifiques pour ce gène chez ces deux espèces. Ce travail a permis de confirmer la proximité phylogénétique de ces deux espèces.

Le fait que *B. capreoli* soit une espèce génétiquement très proche de *B. divergens*, mais avec une gamme d'hôtes différente fait de la comparaison de ces 2 espèces un modèle très intéressant pour l'étude de la spécificité d'hôte et des molécules responsables de cette spécificité. J'ai donc ensuite cherché à identifier chez *B. capreoli*, des gènes orthologues à ceux de *B. divergens*. J'ai commencé par celui codant pour un antigène de surface du mérozoïte, Bd37, impliqué dans l'adhésion du parasite au globule rouge (Article 2).



Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): Isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens* [☆]

Laurence Malandrin ^{*}, Maggy Jouglin, Yi Sun, Nadine Brisseau, Alain Chauvin

INRA, UMR1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, F-44307 Nantes, France

ENVN, UMR1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, F-44307 Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2009

Received in revised form 20 July 2009

Accepted 8 August 2009

Keywords:

Babesia capreoli

Roe deer

In vitro cultivation

Host range

18S rDNA sequencing

Babesia divergens

ABSTRACT

The recent use of the sole molecular identification of *Babesia* infecting European cervids has led to confusion between the closely related *Babesia divergens* and *Babesia capreoli*, and to their grouping together as “*B. divergens*-like”. In order to clarify this taxonomic confusion, *Babesia* from roe deer, cattle and human blood were isolated, cultured and their biological as well as molecular characteristics compared. On this basis, we conclude that: (i) the parasites isolated from roe deer blood are *B. capreoli*; (ii) there are no intraspecific variations in the 18S rDNA within *B. capreoli* and *B. divergens* spp.; (iii) these two species are closely related as demonstrated by their morphology, serological cross-reactions and 99.83% identity in their 18S rDNA; (iv) these two species are distinct as demonstrated by their different abilities to grow in vitro in cattle, human and sheep erythrocytes, by their infectivity for gerbils, and by a conserved three bases difference at positions 631, 663 and 1637 of their 18S rDNA; (v) *B. capreoli* does not pose a threat to either humans or livestock. An integrated description is given of the host range, geographical distribution, biological and molecular characterisation of *B. capreoli*, and reference materials have been deposited at the Museum d'Histoire Naturelle de Paris.

© 2009 Published by Elsevier Ltd. on behalf of Australian Society for Parasitology Inc.

1. Introduction

Babesioses are tick-borne diseases caused by the intra-erythrocytic multiplication of Protozoa of the genus *Babesia* (Apicomplexa, Piroplasmida) (Homer et al., 2000). They are mainly known as diseases of veterinary importance (Zintl et al., 2003), but interest in their zoonotic potential has increased since fatal cases in immunocompromised individuals were observed (Gray, 2006; Hunfeld et al., 2008). In wild animals, clinical manifestations of babesiosis are less documented, however the role of these animals as reservoirs for parasites of their domestic counterparts or humans is often suspected but rarely proven (Penzhorn, 2006). Three species of *Babesia* have been described to date in wild European cervids: *Babesia EU1*, *Babesia divergens* and *Babesia capreoli*.

Babesia EU1 (*Babesia venatorum*) was first described in human babesiosis cases by Herwaldt et al. (2003) in Austria and Italy, and four years later in Germany (Häselbarth et al., 2007). This spe-

cies has also been identified in blood from roe deer in Slovenia (Duh et al., 2005a), France (Bonnet et al., 2007) and Italy (Tampieri et al., 2008), but not from red deer (Duh et al., 2005a).

The cattle parasite *B. divergens* is the main causal agent of human babesiosis in Europe (Gray, 2006; Hunfeld et al., 2008) and probably has one of the largest host ranges described to date for a *Babesia* species (Zintl et al., 2003). Experimental infection with *B. divergens* has been achieved in splenectomized primates (chimpanzees, rhesus monkeys) (Garnham and Bray, 1959), ungulates (roe deer, fallow deer, red deer, mouflon and sheep) (Enigk and Friedhoff, 1962a; Chauvin et al., 2002) and rodents (rats) (Phillips, 1984) as well as in non-splenectomized reindeer, sheep and gerbils (Nilsson et al., 1965; Malandrin et al., 2009; Lewis and Williams, 1979). Fatal naturally acquired babesiosis in captive reindeer in the United Kingdom (UK) was also attributed to *B. divergens* (Langton et al., 2003). The presence of *B. divergens* or *B. divergens*-like parasites in naturally infected roe deer has been recently reported in Slovenia (Duh et al., 2005a), Poland (Sawczuk et al., 2005), Spain (Garcia-Sanmartin et al., 2007), Switzerland (Hoby et al., 2007a) and Italy (Tampieri et al., 2008), in red deer in Slovenia (Duh et al., 2005a) and in chamois in Switzerland (Hoby et al., 2007b). However, the identity of *B. divergens* from wild ungulates based solely on sometimes partial 18S rDNA sequencing is questionable.

[☆] Note. Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank database under Accession Nos. FJ944822 to FJ944828.

^{*} Corresponding author. Address: INRA, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, UMR1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, BP 40706, F-44307 Nantes, France. Tel.: +33 (0) 2 40 68 78 58; fax: +33 (0) 2 40 68 77 51.

E-mail addresses: malandrin@vet-nantes.fr, philippe.maestri@gmail.com (L. Malandrin).

A closely related species, *B. capreoli*, was first described from roe deer in 1962 in Germany (Enigk and Friedhoff, 1962b), with demonstration of susceptibility of splenectomized red deer and non-splenectomized fallow deer to experimental infections with this organism (Enigk and Friedhoff, 1963). Its presence in naturally infected red and sika deer was also demonstrated (Adam et al., 1976; Hinaidy, 1987; Gray et al., 1990). In these early studies, *B. capreoli* was differentiated from *B. divergens* by the fact that it did not infect splenectomized cattle (Enigk and Friedhoff, 1962b; Adam et al., 1976; Gray et al., 1990) or gerbils (Gray et al., 1990). The two species could not be clearly differentiated on the basis of morphology or serology (Gray et al., 1990, 1991). Subsequently, fatal cases in wild roe deer were attributed to *B. capreoli* throughout Europe: Germany (Müller and Rapp, 1971), Sweden (Christensson and Järplid, 1979), Hungary (Ivanics, 1982), Austria (Hinaidy, 1987) and probably Italy (Cancrini et al., 2008), with parasitemia as high as 20–25%.

Babesia EU1, *B. divergens* and *B. capreoli* share the same vector, *Ixodes ricinus* (respectively, Becker et al., 2009; Joyner et al., 1963; Nikol'skii and Pozov, 1972). DNA of the first two *Babesia* spp. has been successfully amplified by PCR from this tick species in numerous European countries: Slovenia (Duh et al., 2001, 2005b), The Netherlands (Nijhof et al., 2007; Wielinga et al., 2009), France (Bonnet et al., 2007), Switzerland (Casati et al., 2006; Hilpertshausen et al., 2006), Austria (Blaschitz et al., 2008) and Poland (Skotarczak and Cichocka, 2001; Pieniazek et al., 2006).

Whereas *Babesia* EU1 can easily be differentiated from the two other species by molecular means (18S rDNA sequencing), distinction between the closely related *B. divergens* and *B. capreoli* remains uncertain, and their status as different species is sometimes questioned (Gray, 2004; Duh et al., 2005a; Hilpertshausen et al., 2006). There is indeed a gap between the early studies (up until 1991) based on biological characterisation of *B. capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962b; Adam et al., 1976; Gray et al., 1990) and recent studies (from 2005 onwards) where identification has

been solely based on molecular comparisons of sometimes only partially sequenced 18S rDNA amplified from ticks or wild ungulates. This led authors to consider the DNA as *B. divergens*, *B. divergens/B. capreoli* or *B. divergens*-like, since identities of 99–100% were obtained on partial sequences. This has several important implications. If there is only one species, then roe deer can be a reservoir for the zoonotic *B. divergens*. If the two species are distinct, does the *B. capreoli* host range include humans, thereby adding a new species to the zoonotic *Babesia*? These uncertainties remain to be clarified.

In this study, *Babesia* from roe deer physically separated from contact with cattle were isolated, cultivated and cloned. A link between the biological data (host specificity and ability to grow in erythrocytes from different species) that allowed clear distinction between the roe deer *B. capreoli* and *B. divergens* and the molecular data (18S rDNA complete sequencing) was then established which confirmed the roe deer *B. capreoli* as a separate species.

2. Materials and methods

2.1. Origin of *Babesia* isolates

The 19 *B. divergens* isolates used in this study originated from human (two), from bovine cases of acute babesiosis in different regions of France (15) (L'Hostis et al., 1995) or from asymptomatic cattle carriers (two) (Malandrin et al., 2004) (Table 1). The nine roe deer included in our study issued from live-trapped members of populations housed in the Wild Fauna Reserves of Chizé (Deux Sèvres, France) or Trois Fontaines (Marne, France). For blood sampling, roe deer were physically restrained and jugular blood samples were drawn into Venoject tubes (Terumo Europe, Leuven, Belgium) containing citrate phosphate dextrose (CPD, Sigma) (1.4 ml CPD/10 ml Venoject tube). Gentamicin (Dutscher, France) and Amphotericin B (Sigma) were added to the CPD to give final concentrations of 50 and 2.5 µg/ml, respectively. Upon arrival in

Table 1
Hosts and geographical origins of *Babesia divergens* isolated from humans or cattle and *Babesia* isolated from roe deer used in this study.

Isolate name	Vertebrate host of origin	Year of isolation	Host status	Geographical origin: County
Rouen 87 F5	Human	1987	Acute babesiosis	Seine-Maritime
CF 2000	Human	2000	Acute babesiosis	Puy-de-Dôme
Bob2A	Cattle	2003	Acute babesiosis	Corrèze
1802A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Cher
2210A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Côtes d'Armor
2706A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Eure
3503B	Cattle	1988	Acute babesiosis	Ille et Vilaine
4411A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Loire Atlantique
5311B	Cattle	1988	Acute babesiosis	Mayenne
5604A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Morbihan
5606A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Morbihan
6116A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Orne
64102A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Pyrénées Atlantiques
6903C	Cattle	1988	Acute babesiosis	Rhône
7211A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Sarthe
7904A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Deux Sèvres
8702A	Cattle	1988	Acute babesiosis	Haute Vienne
135 ^a	Cattle	2003	Asymptomatic carrier	Ille et Vilaine
C139 ^a	Cattle	2004	Asymptomatic carrier	Calvados
2745	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Trois Fontaines, Marne
2770F6	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Trois Fontaines, Marne
2787	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Chizé, Deux Sèvres
2801F10	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Chizé, Deux Sèvres
2806	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Chizé, Deux Sèvres
2807	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Chizé, Deux Sèvres
2820	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Trois Fontaines, Marne
2824	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Trois Fontaines, Marne
3085	Roe deer	2008	Asymptomatic carrier	Chizé, Deux Sèvres

^a We confirmed the pathogenicity of these two isolates cultivated from asymptomatic carriers by experimental infections of two splenectomized calves with development of symptoms typical of acute bovine babesiosis.

the laboratory, the CPD blood samples were kept at 4 °C and processed within 24 h for in vitro culture as described below.

2.2. *Babesia divergens* and roe deer *Babesia* sp. in vitro cultivation in homologous and heterologous erythrocytes and cloning

The parasites from asymptomatic roe deer blood samples were isolated using in vitro cultures as described previously (Malandrin et al., 2004). Briefly, blood samples were centrifuged (800g, 10 min), plasma and buffy coat were discarded, the erythrocytes were washed in RPMI 1640 (Lonza, Belgium) and centrifuged (1200g, 10 min). Cultures were initiated in 24-well culture plates at 7.5% roe deer erythrocytes haematocrit in RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated FCS (Lonza). Gentamicin and Amphotericin B were added at final concentrations of 50 and 2.5 µg/ml, respectively, to avoid fungal, bacterial and *Trypanosoma* development. Cultures were performed in a humidified 6% CO₂ atmosphere at 37 °C. The cultures were fed every 2 or 3 days for 3 weeks by removing 1.5 ml of the medium overlying the erythrocyte layer and replacing it with the same volume of fresh medium (RPMI 1640 + FCS 20%). The presence of developing parasites in the cultures was checked on thin blood smears stained with May-Grünwald-Giemsa (MGG) (Diff Quick, Coper). Sub-cultures were carried out first with autologous roe deer erythrocytes at 2.5% haematocrit in the same culture medium with replacement every 2 or 3 days, and then with fallow deer erythrocytes under the same conditions. Two *Babesia*-free fallow deer blood donors were kept at the Veterinary School of Nantes and fed ad libitum.

Babesia divergens was cultivated either in sheep or cattle red blood cells (RBC) as previously described (Chauvin et al., 2002; Malandrin et al., 2004). *Babesia divergens* isolates Rouen 87 and Bob2 and roe deer *Babesia* sp. isolates 2801 and 2770 were cloned by limiting dilution in sheep, bovine, roe deer or fallow deer erythrocytes, respectively. The cloned cell lines were named Rouen 87 F5, Bob2A, 2801 F10 and 2770 F6.

The ability of erythrocytes from different species to sustain growth of the two species was compared in vitro with erythrocytes collected from cattle, human, sheep and roe deer, prepared as already described. Cultures were initiated with 5 × 10⁵ infected RBC (iRBC)/ml in 24-well culture plates at 2.5% haematocrit, in the same culture medium (RPMI 1640 + FCS 20%). Precultures were prepared in bovine erythrocytes for *B. divergens* Rouen 87 F5 and Bob2A, and in roe deer erythrocytes for roe deer *Babesia* isolates 2745 and 2770. Parasitemia was monitored every day from the second up to the seventh day, and media (RPMI 1640 + FCS 20%) were replaced every 2 days. One well was prepared for each test and parasitemia was calculated on a minimum of 2000 RBCs, or evaluated from observation of 30 microscope fields (about 10,000 erythrocytes). The ability of the remaining roe deer *Babesia* sp. isolates to grow in different erythrocyte types including those of fallow deer was determined by sub-culturing isolates in the different RBC types and evaluating their growth 7 days later (positive or negative).

2.3. Serological testing: indirect IFAT

Cross-reactivity between *B. divergens* and roe deer *Babesia* sp. was examined by collecting serum samples from four roe deer and from one sheep experimentally infected with *B. divergens* Rouen 87, 90 days p.i. (Malandrin et al., 2009) and subjecting them to indirect IFAT. Antigens were prepared from in vitro culture of the corresponding isolates or clones 2770, 2787, 2801F10 and 2806 in fallow deer erythrocytes and of *B. divergens* Rouen 87 F5 and Bob2A in bovine erythrocytes. RBCs were washed in PBS, resuspended in PBS at 5% haematocrit and 10 µl of the suspension were deposited on each well of an 18-well slide and air-dried. Roe deer

sera were diluted at 1/80 in PBS whilst sheep sera were twofold serially diluted from 1/80 to 1/2,560 and incubated with the antigen for 30 min at 37 °C in a humidified chamber. Rabbit anti-goat and anti-sheep FITC conjugates diluted at 1/100 in PBS were used for the roe deer and sheep sera, respectively, and incubated 30 min. Slides were washed in PBS three times for 5 min between incubations and before mounting with Fluoprep. Slides were examined for fluorescence with a Zeiss microscope using a ×40 objective.

2.4. Gerbil experimental infections

Since gerbils (*Meriones unguiculatus*) are used as experimental hosts for *B. divergens* and due to the morphological resemblance between the roe deer isolates and *B. divergens*, gerbils were inoculated i.p. with several of the *Babesia* parasites isolated from roe deer (2745, 2770, 2787, 2801 clone F10, 2824) at a dose of 1 × 10⁶ parasitised fallow deer erythrocytes. As a positive control, *B. divergens* clone Rouen 87 F5 was inoculated in parallel at the same dose. The evolution of parasitemia was monitored 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10 and 17 days p.i., on MGG-stained thin smears of blood collected from the gerbil tails. It was evaluated on about 1 × 10⁴ RBC when parasites were not detectable. All experiments were carried out at the Veterinary School of Nantes, adhering to local (Pays de la Loire Ethics Committee) and national guidelines and laws of experimental work with laboratory animals.

2.5. Extraction of DNA, 18S rDNA gene amplification and sequencing

When parasitemia reached about 10%, the cultures were centrifuged at 1200g for 10 min, washed with PBS and the erythrocyte pellet was frozen at –20 °C in an equal amount of PBS. Genomic DNA was purified from parasitised RBCs using the Promega Wizard genomic DNA purification kit (Promega, France). Three sets of primers (Table 2) were used to amplify (high fidelity Taq Phusion, Finnzymes, Finland) and sequence the complete 18S rDNA genes (1728 bp) from the nine roe deer isolates and from 10 *B. divergens* isolates. Sequencing was performed on both strands directly from the PCR amplification products (Sequencing Platform of BioGenOuest[®], Nantes, France).

The sequences were aligned using the program Clustal W (<http://clustalw.genome.jp/>).

3. Results

3.1. In vitro cultivation of *B. divergens* and roe deer *Babesia* sp. in homologous and heterologous erythrocytes

The multiplication of two *B. divergens* clones (Rouen 87 F5 and Bob2A) in cattle, human, sheep or roe deer erythrocytes was compared with the multiplication of two roe deer *Babesia* isolates (2745 and 2770) in the same erythrocytes. Both *B. divergens* clones were able to develop in each of the tested erythrocytes, with preferential growth in bovine and human RBCs (20–35% within 5 days),

Table 2

Nucleotide (nt) sequences of PCR primers used for amplification and sequencing of *Babesia divergens* and *Babesia capreoli* complete 18S rRNA genes.

Primer	Sequence (5'–3')	Amplified fragments
CRYPTOF	AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCAT	540 bp
CRYP-down	CTGCTGGCACCAGACTTGCC	From nt 1 to 540
BABGF2	GYTTGTAATTGGAATGATGG	559 bp
BABGR2	CCAAAGACTTTGATTTCTCTC	From nt 467 to 1026
CRYP-up2	GCCGCCTAGGGATTGGAGG	957 bp
CRYPTOR	GAATGATCCTCCGAGGTTACCTAC	From nt 957 to 1728

moderate growth in sheep RBCs (5–10% within 5 days) and slow but possible growth in roe deer RBCs (about 1% within 5 days) (Fig. 1). In contrast, neither of the roe deer isolates was able to multiply in cattle, human or sheep erythrocytes, and growth was only possible in roe deer erythrocytes, with a parasitemia of about 1–3% within 5 days and up to 10% within 1 week.

The remaining roe deer isolates were unable to grow when tested on sheep erythrocytes, in contrast to all of the *B. divergens* isolates. Cultures of other roe deer *Babesia* isolates, tested in human and bovine erythrocytes, also failed to grow. All *Babesia* tested (the two clones Rouen 87 F5, Bob2A and the nine roe deer isolates) were able to grow in fallow deer erythrocytes.

3.2. Morphological features of *B. divergens* and roe deer *Babesia* sp. cultivated in vitro in homologous and heterologous erythrocytes

The shapes and sizes of roe deer *Babesia* sp. and *B. divergens* cultivated in homologous and heterologous erythrocytes were described and compared by light microscopic examination of stained smears prepared from in vitro cultures. Various typical intra-erythrocytic forms are shown in Fig. 2.

The roe deer *Babesia* sp. produced round to oval intra-erythrocytic trophozoites of various sizes in roe deer erythrocytes (Fig. 2A). Paired piriforms were divergent and usually occupied the periphery or margin of the erythrocytes. Tetrads or 'Maltese Cross' forms were frequently observed. The presence of eight merozoites within a single erythrocyte was also noted. These features were very similar to those observed for *B. divergens* cultivated in

the same erythrocytes (Fig. 2C), even if the marginal location of the dividing forms was less frequently observed.

In fallow deer erythrocytes, the parasites of both species appeared to be larger (Fig. 2B and D) potentially due to staining intensity differences, and although tetrad forms (Maltese crosses or quadruplets) were seen, they were apparently less frequent and the presence of eight merozoites/erythrocyte was never observed.

3.3. *B. divergens* and roe deer *Babesia* sp. serological cross-reactions

The sera from four roe deer naturally infected with *Babesia* sp. and from one sheep experimentally infected with *B. divergens* were tested against each antigen of the corresponding in vitro cultivated parasites. As shown in Table 3, there was little or no difference in the titre of the sheep serum when titrated against roe deer *Babesia* sp. or another *B. divergens* antigen (Bob2A). The sera from infected deer equally recognised antigens from both species and from different isolates of the same species.

3.4. Gerbil experimental infections

Microscopic examination of blood smears from five gerbils infected with roe deer *Babesia* sp. for 17 days never revealed the presence of parasites in the animals' blood (parasitemia below 0.01%), leading to the conclusion that the *Babesia* roe deer isolates were not pathogenic for gerbils. In contrast, infection with

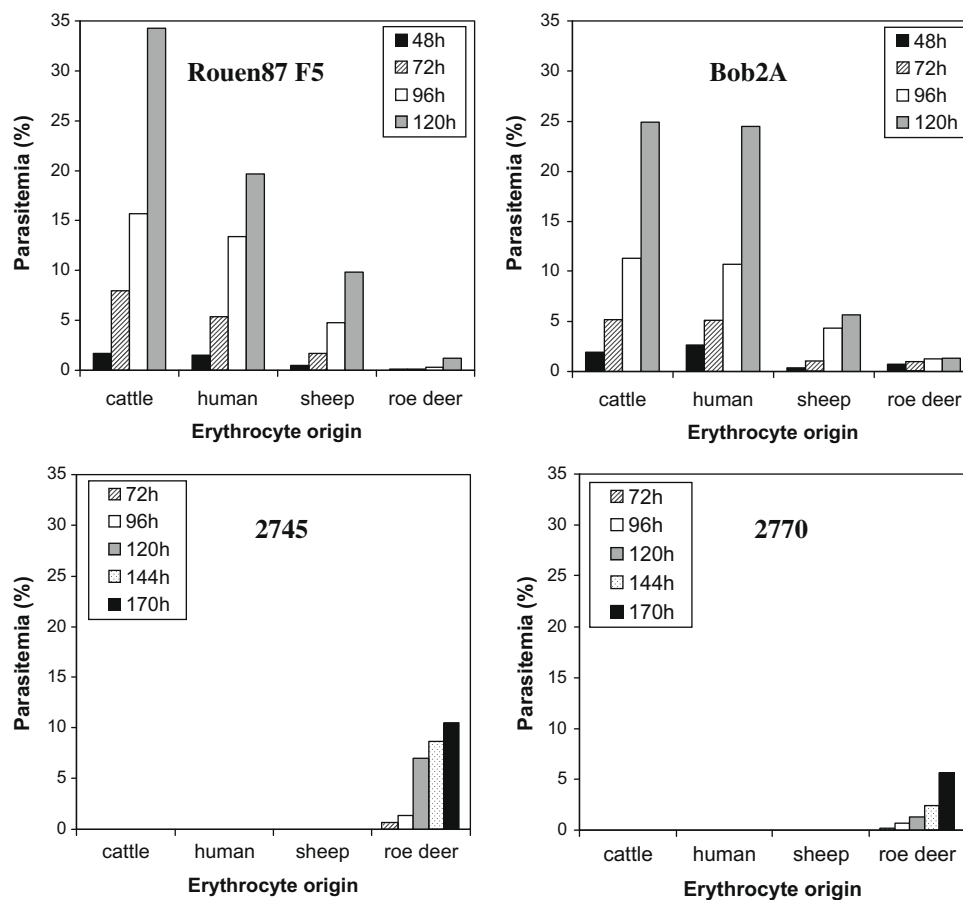


Fig. 1. *Babesia divergens* (Rouen 87 F5 and Bob2A) and roe deer *Babesia* sp. (2745 and 2770) in vitro growth in homologous and heterologous erythrocytes. In vitro cultures were initiated with 5×10^5 infected red blood cells (iRBC)/ml in cattle, human, sheep and roe deer erythrocytes. Parasitemia in each culture well was measured daily between 2 and 7 days, on 2000 erythrocytes when the detected parasite concentrations were above 0.1% and estimated on 10,000 erythrocytes when those were lower.

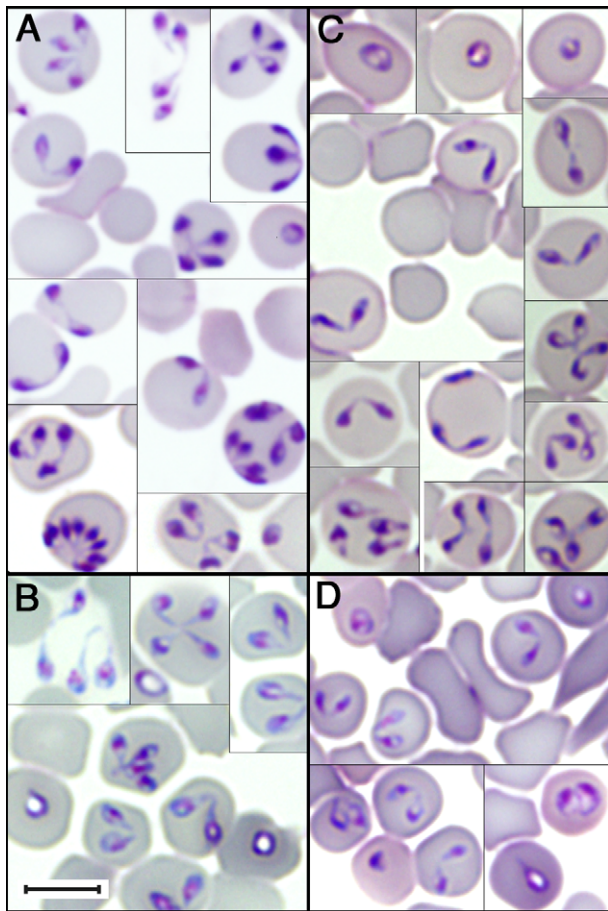


Fig. 2. Photomicrographs of various morphological forms of the roe deer *Babesia* 2770 (A and B) and of *Babesia divergens* Bob2A (C and D) cultured in roe deer (A and C) and fallow deer (B and D) erythrocytes. In each case trophozoites, dividing piriforms and tetrads are represented. Giemsa stain. Scale bar = 5 μ m.

B. divergens Rouen 87 F5 was followed by a fulminating and fatal babesiosis with a parasitemia reaching 41% 5 days p.i.

3.5. 18S rDNA amplification and sequencing

The complete 18S rDNA was sequenced from the nine cultivated roe deer *Babesia* isolates and from 10 cultivated *B. divergens* isolated from human or bovine hosts. Identical sequences were obtained within each group, whatever the geographical origin or the host of origin in the case of *B. divergens*, or the geographical origin alone in the case of roe deer *Babesia* sp. *Babesia divergens*

sequences showed 100% identity with the *B. divergens* reference sequences U16370 and AY046576 from cattle. Roe deer *Babesia* sp. sequences perfectly matched (100%) the single *B. capreoli* sequence (AY726009) deposited in GenBank. The overall sequence identity between sequences from the two species was very high (99.83% identity). Three nucleotide differences were systematically observed between sequences from the two species, at positions 631, 663 and 1637, with AAC for *B. divergens* and GTT for roe deer *Babesia* sp. (Table 4). The second closest match for roe deer *Babesia* sp. sequences was with sequence AY098643 reported for a *B. divergens*-like organism isolated from a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) kept at the Cairngorm Reindeer Centre (Glenmore, Portree, Isle of Skye, Scotland) for which there was a single difference (99.94% identity) (Langton et al., 2003). This was followed by the match with the zoonotic Missouri MO1 and Kentucky sequences (respective accession numbers AY048113 and AY88713) showing two differences or 99.88% identity (Holman et al., 2005). Differences in the 3' PCR primer region, in all these computations, were disregarded.

3.6. Nucleotide sequence accession numbers

The complete 18S rDNA sequences for *B. divergens* isolated from humans (clone Rouen87 F5 and isolate CF2000), *B. divergens* isolated from cattle (clone Bob2A, isolates 1802A and C139), *B. capreoli* clone 2770 F6 from Trois Fontaines and clone 2801 F10 from Chizé were deposited in GenBank under the respective accession numbers FJ944822 to FJ944828.

3.7. Conclusion

Comparison of the biological data presented in our study with host range data from previously published papers led us to conclude that the roe deer isolates characterised in our study correspond to *B. capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962b). This conclusion is supported by molecular characterisation of the 18S rDNA of the parasite, which showed complete identity with the Genbank deposition (AY726009) and confirmed the close relatedness with *B. divergens*.

3.8. Redescription of *B. capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962b)

3.8.1. Host range

Roe deer (*Capreolus capreolus*) is the type host for *B. capreoli*. Parasitologically confirmed clinical cases of babesiosis have been described with parasitemia as high as 20–25% in roe deer (Müller and Rapp, 1971; Christensson and Järplid, 1979; Ivanics, 1982; Hinaidy, 1987; Cancrini et al., 2008), Père David's deer (Hinaidy, 1987) and reindeer (Langton et al., 2003; see Section 4). The

Table 3

Serological cross-reactivities between antigens prepared from in vitro cultures of *Babesia divergens* (Rouen 87 F5 and Bob2A) and *Babesia capreoli* (2770, 2787, 2801F10, 2806) and roe deer or rabbit sera tested in homologous (bold) and heterologous combinations (not bold).

Antigen	Roe deer sera ^a				Rabbit serum ^c					
	2770 ^b	2787 ^b	2801F10 ^b	2806 ^b	Rouen 87 F5 ^d					
	80 ^e	80 ^e	80 ^e	80 ^e	80 ^e	160 ^e	320 ^e	640 ^e	1280 ^e	2560 ^e
Rouen 87 F5	+++ ^f	+++	++	+++	+++	++	++	+	+/-	-
Bob2A	+++	+++	++	++	+++	++	+	+	+/-	-
2770	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+/-	-
2787	+++	+++	+	++	++	+	+	+/-	-	-
2801F10	+++	++	++	++	++	+	+	+/-	+/-	-
2806	++	++	++	++	++	+	+	+/-	+/-	-

^aSera collected from wild roe deer, the blood of which was used to isolate the strains, the references of which are indicated in the line below^b. The rabbit anti-serum^c was produced against *B. divergens* clone Rouen 87 F5 merozoites^d. Reciprocal dilutions used for each serum are indicated^e.

^fThe symbols indicate negative (-), faint (+/-), positive (+) and strongly fluorescent reactions (++ and +++).

Table 4
Integrated table of the results from our study illustrating different features between *Babesia divergens* and *Babesia capreoli*.

Origin	Species and isolate reference	In vitro multiplication on erythrocytes from					In vivo infection Gerbil	ssrDNA gene Nucleotide at positions 631, 663, 1637
		Humans	Cattle	Sheep	Roe deer	Fallow deer		
<i>B. divergens</i>								
Human	Rouen 87 F5	+	+	+	+	+	+	A, A, C
	CF 2000	+	+	+	nt	nt	+	A, A, C
Cattle	Bob 2A	+	+	+	+	+	+	A, A, C
	1802A	nt	+	+	nt	nt	+	A, A, C
	2210	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	2706A	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	3503B	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	4411A	nt	+	+	nt	nt	+	A, A, C
	5311B	nt	+	+	nt	nt	+	A, A, C
	5604A	nt	+	+	nt	nt	+	A, A, C
	5606A	nt	+	+	nt	nt	+	A, A, C
	6116A	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	64102A	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	6903C	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	7211A	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	7904A	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	8702A	nt	+	+	nt	nt	+	ns
	135	nt	+	+	nt	nt	+	A, A, C
C139	nt	+	+	nt	nt	+	A, A, C	
<i>B. capreoli</i>								
Roe deer	2745 (3F)	–	–	–	+	+	–	G, T, T
	2770 (3F)	–	–	–	+	+	–	G, T, T
	2787 (C)	–	–	–	+	+	–	G, T, T
	2801F10 (C)	nt	–	–	+	+	–	G, T, T
	2806 (C)	nt	nt	–	+	+	nt	G, T, T
	2807 (C)	nt	–	–	+	+	nt	G, T, T
	2820 (3F)	nt	nt	–	+	+	nt	G, T, T
	2824 (3F)	–	–	–	+	+	–	G, T, T
	3085 (C)	nt	nt	–	+	+	nt	G, T, T

nt, not tested; ns, not sequenced; (3F) from the reserve of Trois Fontaines (France); (C) from the reserve of Chizé (France).

symptoms and necropsic features are typical of babesiosis and include icterus, haemoglobinuria, haematuria, splenomegaly, haemosiderosis of liver and spleen, and pulmonary oedema. *Babesia capreoli* has also been reported in asymptomatic and naturally infected red deer (*Cervus elaphus*) (Adam et al., 1976; Blewett and Adam, 1978; Hinaidy, 1987), sika deer (*Cervus nippon*) (Gray et al., 1990), Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) (Hinaidy, 1987) and probably reindeer (*Rangifer tarandus*) (Langton et al., 2003; see Section 4). By experimental infection, it can also infect fallow deer (*Dama dama*), splenectomized red deer (Enigk and Friedhoff, 1963; Gray et al., 1990) and splenectomized sika deer (Gray et al., 1990). *Babesia capreoli* is able to grow in vitro in roe deer and fallow deer erythrocytes (this study). *Babesia capreoli* seems to be able to infect various members of the cervidae family, but roe deer seems to be more susceptible, whilst sika deer is reported to be more resistant (Gray et al., 1990).

3.8.2. Geographical distribution

The presence of *B. capreoli* in most European countries can be postulated on the basis of direct or indirect evidence. Reported parasitologically confirmed clinical cases of babesiosis in roe deer have attested the presence of *B. capreoli* in Germany (Müller and Rapp, 1971), Sweden (Christensson and Järplid, 1979), Hungary (Ivanics, 1982) and probably Italy (Cancrini et al., 2008). Deer were successfully experimentally infected with isolates from asymptomatic cervids in Scotland (Adam et al., 1976; Blewett and Adam, 1978) and Ireland (Gray et al., 1990). The existence of asymptomatic roe deer carriers in two geographically distant fauna reserves in France (Trois Fontaines and Chizé) was demonstrated in our study. The presence of *Babesia* in roe deer in the Trois Fontaines reserve was demonstrated by serological studies, 25 years ago (Blancou, 1983). The presence of *B. capreoli* in red or roe deer can be postulated on the basis of serological studies, in several other

European countries (The Netherlands, Belgium, Ireland, Scotland) (respectively, Dorrestein et al., 1996; Lonneux et al., 1991; Gray et al., 1990; Latif and Adam, 1973) especially since experimental infections with blood from serologically positive animals result in the development of clinical babesiosis in roe deer (Adam et al., 1976; Blewett and Adam, 1978).

3.8.3. Tick vector

Ixodes ricinus has been demonstrated to be a competent vector for *B. capreoli* from infected roe deer, and transovarial and transstadial vertical transmission of the parasite within its vector has also been proven (Nikol'skii and Pozov, 1972).

3.8.4. Morphological features from in vitro culture in roe deer blood

The morphology and sizes of *B. capreoli* parasites grown in vitro in roe deer erythrocytes are consistent with those described for small *Babesia* (1–3 µm). Round to oval trophozoites evolve into dividing piroforms that are preferentially located along the margins of erythrocytes. Tetrad forms are frequently observed, either as quadruplet or Maltese cross forms, another characteristic of small *Babesia*. The marginal location of *B. capreoli* was also described by Enigk and Friedhoff (1962b) on blood smears prepared from experimentally infected roe deer blood. However, in their description, tetrad forms were not as frequent, probably related to the in vivo versus in vitro origin of the described samples. Variations in piroform size and the frequency of tetrads were noted when fallow deer erythrocytes were used in vitro.

3.8.5. Different characteristics from the close relative *B. divergens* (Table 4)

Babesia divergens host range (described from experimental infections) overlaps that of *B. capreoli*, but the two species can be differentiated by experimental infections of gerbils (*Meriones*

unguiculatus) or cattle (Enigk and Friedhoff, 1962a; Gray et al., 1990, 1991; this study), neither of which are susceptible to *B. capreoli*. This can also be done in vitro with cattle or human erythrocytes which are unable to sustain *B. capreoli* growth. However, care should be taken in using this differential feature with sheep erythrocytes due to the huge variability of in vitro sheep erythrocyte susceptibility to *B. divergens* (Malandrin et al., 2009).

Sequencing of the complete 18S rDNA for 10 *B. divergens* and nine *B. capreoli* isolates revealed a clear distinction between these two species at three constant positions (nucleotides (nt) 631, 663 and 1637) with AAC for *B. divergens* and GTT for *B. capreoli*. It also confirmed the close relatedness of these two species (99.83% identity) which cannot be differentiated by morphological or serological features.

3.8.6. Type specimens

Type material, consisting of stained thin blood smears from in vitro culture on fallow deer erythrocytes and genomic DNA from the clones 2801 F10 and 2770 F6, has been deposited at the Museum d'Histoire Naturelle in Paris, France with the respective collection numbers MNHN ZS 30 and MNHN ZS 31. Clones 2801 F10 and 2770 F6 can be considered as syntypes and are being maintained as cryostabilates in our research laboratory at the National Veterinary School of Nantes, France. A backup is also being kept at the Museum d'Histoire Naturelle de Paris.

4. Discussion

Almost 50 years have passed since the first morphological description of *B. capreoli* in roe deer in Germany and its naming according to the host (*Capreolus capreolus*) from which it was isolated (Enigk and Friedhoff, 1962b). The phenotypic features of the intra-erythrocytic stages fall within the range described for small *Babesia* parasites (1–3 µm) and a preferential marginal localisation of *B. capreoli* within the erythrocytes was reported (Enigk and Friedhoff, 1962b; Adam et al., 1976; Gray et al., 1990). We believe we have performed the first in vitro isolation of this species allowing its biological as well as molecular precise description. We confirmed in our study that *B. capreoli* and *B. divergens* are morphologically indistinguishable from each other (Gray et al., 1990) as well as the already described strong serological cross-reactivities between them (Gray et al., 1991). *Babesia capreoli* differentiation from *B. divergens* was possible on the basis of its incapacity to infect gerbils (Gray et al., 1990) and cattle as demonstrated by experimental infections (Enigk and Friedhoff, 1962b; Gray et al., 1990) and epidemiological studies (Schmid et al., 2008). We confirmed these features and added new differential characteristics. The in vitro tests used in our study also clearly demonstrated the potential host range differences between the two species, adding sheep and humans as new differential hosts in vitro. It is reasonable to conclude that *B. capreoli* is not a zoonotic species due to its inability to develop in vitro in human erythrocytes. At the molecular level, sequencing of the complete 18S rDNA from cattle/human (*B. divergens*) and roe deer *Babesia* (*B. capreoli*) isolates indicated perfect sequence conservations within each species and three conserved nucleotide differences between the two groups at positions 631, 663 and 1637 (AAC and GTT, respectively). The two species can thus be differentiated using this molecular signature. The molecular characterisation based on 18S rDNA sequencing of a *Babesia* sp. responsible for clinical babesiosis in a roe deer has recently produced a signature similar to *B. capreoli* (GTT) (Cancrini et al., 2008).

Although roe deer and red deer have been demonstrated to be natural hosts for *B. capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962b; Adam et al., 1976), the identity of species naturally infecting reindeer re-

mains unclear. Experimental infection of reindeer with *B. divergens* led to the development of fulminating acute babesiosis (Nilsson et al., 1965). Naturally acquired babesiosis in reindeer in Scotland was also attributed to *B. divergens* (Langton et al., 2003), even though gerbil infection, by injection of blood from the infected reindeer, could not be established which casts a doubt on this classification. Furthermore, the complete 18S rDNA sequence of the reindeer piroplasm (AY098643) was 99.8% identical to the *B. divergens* sequence U16370. The organism causing babesiosis in this reindeer herd was thus considered to be *B. divergens* and later described as such (Penzhorn, 2006). However, three of the four nucleotides differing between the two sequences were at positions 631, 663 and 1637 with a GTT corresponding to the *B. capreoli* sequence determined in our study.

The occurrence of clinical babesiosis on chamois (*Rupicapra rupicapra*) was first documented by Bouvier in 1965, with a parasitemia of 50% and typical symptoms of babesiosis (anaemia, icterus, splenomegaly, liver hypertrophy). Five fatal cases of babesiosis with peripherally localised small *Babesia* were attributed to *B. divergens/B. capreoli* on the basis of 18S rDNA partial sequencing (Hoby et al., 2007a). Our analysis of these sequences revealed a signature typical of *B. capreoli* at positions 631 and 663 (GT). Further sequence analysis of internal transcribed spacers 1 and 2 from one of the chamois piroplasms as well as bovine and roe deer piroplasms confirmed the differentiation into two species, thereby supporting the *B. capreoli* designation for the *Babesia* spp. circulating in wild ruminants (Schmid et al., 2008). These studies also extend the *B. capreoli* host range to include the bovidae.

The geographical distribution of *B. capreoli* can be inferred from the localisation of natural clinical cases, from serological studies, from experimental transmission studies using naturally infected animals, from culture and characterisation of parasites from blood, and from molecular identification (see Section 3.8.2 for references). *Babesia capreoli* seems to be present throughout Europe and its distribution probably overlaps the geographical distribution of the vector (*I. ricinus*) and cervids.

Babesia divergens could not be isolated from roe deer in our study (data not shown), but the roe deer in the reserves examined were physically separated from contact with cattle pastures, thus limiting the risk of transmission of *B. divergens* via *I. ricinus*-infected ticks. Determination of the role of roe deer as reservoirs for *B. divergens* will now require thorough sequence analysis of the 18S rDNA already amplified from cervids. Further studies involving molecular characterisation of *Babesia* spp. isolated from hunted roe deer sharing biotopes (pastures) with *B. divergens*-infected cattle and ticks will be required to clarify the role of roe deer as reservoirs of the zoonotic *B. divergens*. Despite the demonstrated ability of *B. divergens* to multiply in roe deer erythrocytes, this animal is probably not a favourable host compared with cattle or humans, if we refer to its poor growth in erythrocytes from this species.

By combining biological data (host specificity and ability to grow in vitro in erythrocytes from different species) with genetic data (18S rDNA complete sequencing) on in vitro cultivated and cloned *B. capreoli* isolates, we have been able to link the first biological descriptions of this species (Enigk and Friedhoff, 1962b; Gray et al., 1990) to the recent molecular characterisations of *B. divergens*-like parasites. *Babesia divergens* and *B. capreoli* 18S rDNA sequences differ at only three positions (99.83% identity) which is apparently sufficient to accord them different species status. These three differences can be regarded as a sort of signature to differentiate the two species. Whether such signatures linked with biological features could be used to identify other *B. divergens*-like parasites isolated from human babesiosis cases in Europe (Cento-lima et al., 2003; Olmeda et al., 1997) or the USA (Herwaldt et al., 1996; Beattie et al., 2002; Holman et al., 2005) remains to be clarified.

Acknowledgements

This work was supported by research funds from the Institut National de la Recherche Agronomique and the Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Y. Sun's PhD thesis is financed by Region Pays de Loire. We particularly thank Guy Van Laere and Daniel Delorme for their welcome at the Chizé Reserve (ONCFS) and at the Trois Fontaines Reserve as well as for the technical assistance from their teams when collecting roe deer samples. Thanks are also due to the working group Ticks and tick-transmitted diseases (TMT) of the French network of scientists working on evolution and sustainable interactions (REID) and to the sequencing Platform of BioGenOuest®. The authors are grateful to Suzanne Bastian for her critical reading of the manuscript.

References

- Adam, K.M., Blewett, D.A., Brocklesby, D.W., Sharman, G.A., 1976. The isolation and characterization of a *Babesia* from red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitology* 73, 1–11.
- Beattie, J.F., Michelson, M.L., Holman, P.J., 2002. Acute babesiosis caused by *Babesia divergens* in a resident of Kentucky. *N. Engl. J. Med.* 347, 697–698.
- Becker, C., Bouju-Albert, A., Jouglin, S., Chauvin, A., Malandrin, L., 2009. Natural transmission of zoonotic *Babesia* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 320–322.
- Blancou, J., 1983. Serological testing of wild roe deer (*Capreolus capreolus* L.) from the Trois Fontaines forest region of Eastern France. *J. Wildlife Dis.* 19, 271–273.
- Blaschitz, M., Narodoslavsky-Gföller, M., Kanzler, M., Stanek, G., Walochnik, J., 2008. *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4841–4846.
- Blewett, D.A., Adam, K.M., 1978. *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) in red deer in Scotland. In: Wilde, J.K.H. (Ed.), *Tick-Borne Diseases and Their Vectors*. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, pp. 377–378.
- Bonnet, S., Jouglin, S., L'Hostis, M., Chauvin, A., 2007. *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1208–1210.
- Bouvier, G., 1965. Observations on the diseases of game and wild animals in 1963 and 1964 [French]. *Schweiz Arch. Tierheilkd.* 107, 634–647.
- Cancrini, G., Gabrielli, S., Lori, A., Grifoni, G., Calderini, P., 2008. Morphology and genetics of a *Babesia* isolate from *Capreolus capreolus*. *J. Wildlife Dis.* 44, 168–171.
- Casati, S., Sager, H., Gern, L., Piffaretti, C.J., 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13, 65–70.
- Centeno-lima, S., do Rosario, V., Parreira, R., Maia, A.J., Freudenthal, A.M., Nijhof, A.M., Jongejan, F., 2003. A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Trop. Med. Int. Health* 8, 760–764.
- Chauvin, A., Valentin, A., Malandrin, L., L'Hostis, M., 2002. Sheep as a new experimental host for *Babesia divergens*. *Vet. Res.* 33, 429–433.
- Christensson, D., Järplid, B., 1979. *Babesia capreoli* in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden (Swedish). *Svensk Vet. Tidsn.* 21, 231–232.
- Dorrestein, G.M., Jongejan, F., Rijpkema, S., 1996. Survey of tick related problems in roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. *Vet. Q.* 18, 148.
- Duh, D., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., 2001. Diversity of *Babesia* infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J. Clin. Microbiol.* 39, 3395–3397.
- Duh, D., Petrovec, M., Bidovec, A., Avsic-Zupanc, T., 2005a. Cervids as babesiae hosts, Slovenia. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1121–1123.
- Duh, D., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., 2005b. Molecular characterization of human pathogen *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks from Slovenia. *J. Parasitol.* 91, 463–465.
- Enigk, K., Friedhoff, K., 1962a. On the host specificity of *Babesia divergens* (M'Fadyean and Stockman, 1911) (German). *Zeitschr. Parasitenk.* 21, 238–256.
- Enigk, K., Friedhoff, K., 1962b. *Babesia capreoli* n. sp. in the roe deer (*Capreolus capreolus* L.) (German). *Zeitschr. Tropenmed. Parasitol.* 13, 8–20.
- Enigk, K., Friedhoff, K., 1963. Zur Empfänglichkeit von Rot- und Damhirsch für *Babesia capreoli* (Piroplasmidea) (German). *Z. Tropenmed. Parasitol.* 14, 57–62.
- García-Sanmartín, J., Aurtentxe, O., Barral, M., Marco, I., Lavin, S., García-Perez, A.L., Hurtado, A., 2007. Molecular detection and characterization of piroplasms infecting cervids and chamois in Northern Spain. *Parasitology* 134, 391–398.
- Garnham, P.C.C., Bray, R.S., 1959. The susceptibility of the higher primates to piroplasms. *J. Protozool.* 6, 352–355.
- Gray, J.S., 2004. *Babesia* sp. emerging intracellular parasites in Europe. *Pol. J. Microbiol.* 53S, 55–60.
- Gray, J.S., 2006. Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *Int. J. Med. Microbiol.* 296 (Suppl. 40), 131–136.
- Gray, J.S., Murphy, T.M., Taylor, S.M., Blewett, D.A., Harrington, R., 1990. Comparative morphological and cross transmission studies with bovine and deer babesias in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 9, 185–193.
- Gray, J.S., Murphy, T.M., Waldrup, K.A., Wagner, G.G., Blewett, D.A., Harrington, R., 1991. Comparative studies of *Babesia* spp. from white-tailed and sika deer. *J. Wildlife Dis.* 27, 86–91.
- Häselbarth, K., Tenter, A.M., Brade, V., Krieger, G., Hunfeld, K.P., 2007. First case of human babesiosis in Germany – clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 197–204.
- Herwaldt, B., Persing, D.H., Préçigout, E.A., Goff, W.L., Mathiesen, D.A., Taylor, P.W., Eberhard, M.L., Gorenflot, A.F., 1996. A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans. *Ann. Intern. Med.* 124, 643–650.
- Herwaldt, B., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 942–948.
- Hilpertshausen, H., Deplazes, P., Schnyder, M., Gern, L., Mathis, A., 2006. *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6503–6507.
- Hinaidy, H.K., 1987. Blood parasites of wildliving ruminants in Austria. *J. Vet. Med. B* 34, 81–97.
- Hoby, S., Schmid, N., Mathis, A., Deplazes, P., Robert, N., Ryser-Degiorgis, M.-P., 2007a. Epizootiological investigations after fatal *Babesia* sp. infection in chamois from Switzerland. *Verh. Ber. Erkr. Zoot.* 43, 42–44.
- Hoby, S., Robert, N., Mathis, A., Schmid, N., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Deplazes, P., Ryser-Degiorgis, M.-P., 2007b. Babesiosis in free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) from Switzerland. *Vet. Parasitol.* 148, 341–345.
- Holman, P.J., Spencer, A.M., Droleskey, R.E., Goethert, H.K., Telford, S.R., 2005. In vitro cultivation of a zoonotic *Babesia* sp. isolated from Eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) on Nantucket Island, Massachusetts. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3995–4001.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 451–469.
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A., Gray, J.S., 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38, 1219–1237.
- Ivanics, E., 1982. A fatal case of babesiosis in a deer (Hungarian). *Magyar Allatorvosok Lapja* 37, 625–626.
- Joyner, L.P., Davies, S.F., Kendall, S.B., 1963. The experimental transmission of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus*. *Exp. Parasitol.* 14, 367–373.
- Langton, C., Gray, J.S., Waters, P.F., Holman, P.J., 2003. Naturally acquired babesiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) herd in Great Britain. *Parasitol. Res.* 89, 194–198.
- Latif, B.M., Adam, K.M., 1973. Antibody to *Babesia* in Scottish red deer (*Cervus elaphus*). *Nature* 241, 476–477.
- Lewis, D., Williams, H., 1979. Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*. *Nature* 278, 170.
- L'Hostis, M., Chauvin, A., Valentin, A., Marchand, A., Gorenflot, A., 1995. Large-scale survey of *Babesia divergens* bovine babesiosis in France. *Vet. Rec.* 136, 36–38.
- Lonneux, J.F., Lossou, B., Collin, B., 1991. Specific antibodies against *Babesia* in deers in the South of Belgium (French). *Ann. Med. Vet.* 135, 119–121.
- Malandrin, L., L'Hostis, M., Chauvin, A., 2004. Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using in vitro culture. *Vet. Res.* 35, 131–139.
- Malandrin, L., Jouglin, M., Moreau, E., Chauvin, A., 2009. Individual heterogeneity in erythrocyte susceptibility to *Babesia divergens* is a critical factor for the outcome of experimental spleen-intact sheep infections. *Vet. Res.* 40, 25.
- Müller, B., Rapp, J., 1971. Babesiose als Todesursache bei einem Rehkitz (German). *Tierärztliche Umschau* 6, 314–315.
- Nijhof, A.M., Bodaan, C., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F., Jongejan, F., 2007. Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 585–595.
- Nikol'skii, S.N., Pozov, S.A., 1972. *Ixodes ricinus* ticks as carriers of *Babesia capreoli* in the roe deer (Russian). *Veterinarya* 4, 62.
- Nilsson, O., Nordkvist, M., Rydén, L., 1965. Experimental *Babesia divergens* infection in reindeer (*Rangifer tarandus*). *Acta Vet. Scand.* 6, 353–359.
- Olmeda, A.S., Armstrong, P.M., Rosenthal, B.M., Valladares, B., del Castillo, A., de Armas, F., Miguez, M., Gonzalez, A., Rodriguez Rodriguez, J.A., Spielman, A., Telford III, S.R., 1997. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop.* 67, 229–234.
- Penzhorn, B.L., 2006. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. *Vet. Parasitol.* 138, 11–21.
- Phillips, R.S., 1984. *Babesia divergens* in splenectomised rats. *Res. Vet. Sci.* 36, 251–255.
- Pieniazek, N., Sawczuk, M., Skotarczak, B., 2006. Molecular identification of *Babesia* parasites isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in northwestern Poland. *J. Parasitol.* 92, 32–35.
- Sawczuk, M., Maciejewska, A., Adamska, M., Skotarczak, B., 2005. Roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) as a reservoir of protozoans from *Babesia* and *Theileria* genus in northwestern Poland (Polish). *Wiad. Parazytol.* 51, 243–247.
- Schmid, N., Deplazes, P., Hoby, S., Ryser-Degiorgis, M.-P., Edelhofer, R., Mathis, A., 2008. *Babesia divergens*-like organisms from free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) and roe deer (*Capreolus c. capreolus*) are distinct from *B. divergens* of cattle origin – an epidemiological and molecular genetic investigation. *Vet. Parasitol.* 154, 14–20.
- Skotarczak, B., Cichočka, A., 2001. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 8, 187–189.
- Tampieri, M.P., Galuppi, R., Bonoli, C., Cancrini, G., Moretti, A., Pietrobello, M., 2008. Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 667–674.
- Wielinga, P.R., Fonville, M., Sprong, H., Gaasenbeek, C., Borgsteede, F., Giessen, J.W., 2009. Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in The Netherlands during a 5-year surveillance: 2003–2007. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9, 119–122.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., Gray, J.S., 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 622–636.

Article N° 2 : Molecular cloning and genetic polymorphism of *Babesia capreoli* gene *Bcp37/41*, an orthologue of *Babesia divergens* merozoite surface antigen *Bd37* (Clonage moléculaire et polymorphisme génétique du gène *Bcp37/41* chez *Babesia capreoli*, un orthologue de l'antigène de surface du mérozoïte *Bd37* de *B. divergens*)

Communication courte acceptée à Veterinary Parasitology

Bd37 est une protéine de surface du mérozoïte de *Babesia divergens* dont le rôle dans l'adhésion du parasite au globule rouge est suspecté. Etant donné la proximité phylogénétique entre *B. divergens* et *B. capreoli*, la présence d'un orthologue de *Bd37* chez cette nouvelle espèce pouvait être supposée.

Le gène *Bd37* étant variable, nous avons utilisé des amorces capables d'amplifier les différents variants de ce gène chez *B. divergens*. Nous avons amplifié un seul produit PCR partiel de taille attendue pour ce gène à partir de l'ADN génomique de *B. capreoli*. La séquence complète du gène a ensuite été obtenue par RACE-PCR pour deux lignées clonales de *B. capreoli* sélectionnées pour leur origine géographique et la taille très différente des produits d'amplification partielle. L'absence d'introns a été vérifiée par RT-PCR et séquençage. Les alignements réalisés entre ces 2 séquences et la séquence de *Bd37* chez *B. divergens* révèlent une organisation comparable de protéine : séquence signal, ancre GPI, région N-terminale très variable avec de nombreuses insertions/délétions, conservation de résidus cystéine impliqués dans la structure secondaire. Les homologies avec *Bd37* sont importantes : 54,8% au niveau acides aminés pour les deux séquences C-terminales de *B. capreoli*. Cet orthologue de *Bd37* a donc été appelé *Bcp37/41*, en raison de la variation de taille attendue de la protéine correspondante. Des homologies fonctionelles entre *Bd37* et *Bcp37/41* sont supposées : localisation à la surface du mérozoïte, rôle dans l'échappement du parasite face au système immunitaire et l'attachement initial aux érythrocytes. L'analyse des amplicons par RFLP et le séquençage partiel révèlent un extrême polymorphisme de *Bcp37/41*, plus élevé que celui observé pour son orthologue *Bd37*.

Perspectives : Les séquences obtenues pour *Bcp37/41* ont été utilisées afin de définir des

amorces permettant l'amplification spécifique de *B. capreoli*. Une PCR nichée spécifique de chacune des deux espèces est en cours de mise au point et son utilisation est prévue pour des études épidémiologiques. Ce travail ne peut donc pas être valorisé dans le manuscrit de thèse mais cette application de mes résultats constituera un 5^{ème} article.

**Molecular cloning and genetic polymorphism of *Babesia capreoli* gene
Bcp37/41, an ortholog of *Babesia divergens* merozoite surface antigen
*Bd37***

Yi Sun ^{a, b, c} ♦, Maggy Jouglin ^{a, b} ♦, Alain Chauvin ^{a, b, c}, Laurence Malandrin ^{a, b} *

^a INRA, UMR1300, F-44307 Nantes, France.

^b ONIRIS, UMR1300, F-44307 Nantes, France.

^c Université Nantes Angers Le Mans, France.

INRA, ONIRIS, UMR1300, Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risques, BP 40706,
F-44307 Nantes, France.

♦ Y.S. and M.J. contributed equally to this work.

✧ Note : Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the Genbank™
database under the accession nos. GQ246177, GQ246178, HM156207 to HM156210.

* Corresponding author - INRA, ONIRIS, UMR1300, Bio-agression, Epidémiologie et Analyse
de Risque, BP 40706, F-44307 Nantes, France. Phone : +33 (0) 2 40 68 78 58 - Fax : +33 (0) 2
40 68 77 51 - E-mail address : laurence.malandrin@oniris-nantes.fr

Abstract

Babesia divergens and *Babesia capreoli* are closely related species with distinct host ranges, a zoonotic feature being described only for *B. divergens*. The two species are 99.8% similar in the 18S rDNA gene sequence and indistinguishable by morphological or serological means, leading to confusion as to their species status. The phylogenetic relatedness between the two species, and the frequent involvement of surface components in serological cross-reactions led us to postulate that an ortholog of *Bd37*, the merozoite surface antigen described for *B. divergens*, could also exist in *B. capreoli*. We were able to amplify a single partial PCR product from *B. capreoli* genomic DNA using primers specific for the *B. divergens* merozoite surface protein coding gene *Bd37*, and sequencing confirmed the presence of a *Bd37* ortholog in *B. capreoli*, named *Bcp37/41*. The full sequences of the *Bcp37/41* genes and their intron-exon structures were obtained for two cloned lines of *B. capreoli*. They suggest functional homologies between *Bd37* and *Bcp37/41* such as their surface localization, their role in immune escape mechanism and in the initial non specific attachment to the erythrocyte. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the amplicons and partial sequencing revealed an extreme polymorphism within *B. capreoli*, greater than the one observed for its ortholog *Bd37*. Such a marker could thus be useful in epidemiological as well as phylogenetic studies.

Keywords : *B. divergens*, *B. capreoli*, merozoite surface antigen, *bd37*, polymorphism, diagnostic marker.

Introduction

Babesia divergens and *Babesia capreoli* are tick-borne transmitted Protozoa responsible for piroplasmiasis in cattle and human (Zintl et al., 2003; Gray, 2006; Hunfeld, 2008), and roe deer, respectively (Enigk and Friedhoff, 1962a; Cancrini et al., 2008), due to their multiplication within the erythrocytes of the vertebrate hosts. Since the first description of *B. capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962a), the close relatedness of the two species has been well documented: they are morphologically very similar and are characterized by strong serological cross-reactions (Gray et al., 1990, 1991 ; Malandrin et al., 2010). They share the same tick vector, *Ixodes ricinus* (Joyner et al., 1963 ; Nickols'kii 1972) and have an overlapping vertebrate host range (reindeer and splenectomized deer) (Enigk and Friedhoff 1962 a and b; Nilsson et al., 1965 ; Langton et al., 2003). However, these species do differ in their host specificity: *B. capreoli* is unable to infect cattle or gerbils, which are respectively the natural and experimental hosts of *B. divergens* (Enigk and Friedhoff, 1962a ; Lewis and Williams, 1979 ; Gray et al., 1990 ; Malandrin et al., 2010). *B. divergens* is now recognized as a zoonotic parasite (Kjemtrup and Conrad, 2000). In vitro culture of *B. divergens* in human erythrocytes has frequently been described (Brasseur et al., 1998; Gorenflot et al., 1991; Lobo, 2005; Malandrin et al., 2010), but in vitro multiplication of *B. capreoli* in human erythrocytes has never been demonstrated (Malandrin et al., 2010), indicating probably the non zoonotic character of this species. Genetically, species differences in the sequences of the internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS-1, ITS-2) have been described (Schmid et al., 2008; Hoby et al., 2009), and differences between 18S rDNA sequences of the two species are consistently limited to 3 bases (Malandrin et al., 2010). This has led to confusion of the two species and their grouping together as “*B. divergens*-like” when PCR based on 18S rDNA alone was used to identify detected pathogens (Duh et al., 2005 ; Sawczuk et al., 2005 ; Hilpertshauser et al., 2006; Garcia-Sanmartin et al., 2007 ; Tampieri et al., 2008).

The phylogenetic relatedness of these two species, together with their presence in the same habitats and even in the same hosts require the use of markers present in both species but sufficiently variable to access epidemiological data such as reservoir host preference and dispersion features. Apart from the 18S rDNA, the few genes that are sequenced belong to *B. divergens* and most of them are usually known to be highly conserved (*hsp20*, β tubulin, subtilisine, *Ranbp1*) (respectively Montero et al., 2008; Carcy et al., 1991; Caccio et al., 2000; Montero et al., 2006; Delbecq et al., 2003), and thus not suitable. On the contrary, merozoite surface exposed proteins are usually encoded by genetically variable genes, because of the selection pressure applied by the host immune system. For our purpose, the best candidate described for *B. divergens* was Bd37.

Bd37 is an immunodominant antigen of 37 kDa, that was first detected by immunoblot with sera from *B. divergens*-infected cattle and humans (Gorenflot et al., 1991) and able to elicit a protective response against challenge (Carcy et al., 1995; Delbecq et al., 2002, 2006; Precigout et al., 2004; Hadj-Kaddour et al., 2007). The cell surface localization of this antigen was attested by fluorescence microscopy with a Bd37 specific antiserum (Carcy et al., 1995), together with the GPI anchoring of this protein to the merozoite cell surface (Delbecq et al., 2002). Since the purified protein is able to bind to erythrocytes, albeit non-specifically, its role in erythrocyte invasion has been postulated (Delbecq et al., 2008). As also described for other merozoite surface proteins (Msa-1 and Msa-2 of *B. bovis*, Msp-1 of *Plasmodium falciparum*), the *Bd37* gene is polymorphic and 5 clades have been described to this date on the basis of PCR-RFLP analysis performed on 14 different isolates (Hadj-Kaddour et al., 2007).

The aim of the present study was thus to determine if an ortholog of Bd37 exists in *B. capreoli*, to sequence the full gene, to evaluate its polymorphism and value as a potential marker to perform epidemiological studies or phylogenetic analysis.

2. Materials and methods

2.1. Origin of *B. divergens* and *B. capreoli* isolates used in this study

B. divergens clonal line of human origin (Rouen 87 F5) and *B. divergens* isolates from cattle, either with acute babesiosis (Bob2 and 2210) (L'Hostis et al., 1995) or as asymptomatic carrier (C139) were used (Malandrin et al., 2004). The *B. capreoli* isolates were obtained from asymptomatic roe deer housed either in the Wild Fauna Reserve of Chizé (Deux Sèvres, France) (2787, 2801, 2806, 2807 and 3085) or Trois Fontaines (Marne, France) (2745, 2770 and 2820). Some of the isolates used in this study, together with their biological and molecular characterization, have been described previously (Malandrin et al., 2010).

2.2. In vitro cultivation and cloning of *B. divergens* and *B. capreoli*

B. divergens was cultivated in vitro in bovine red blood cells, whereas *B. capreoli* was cultivated in fallow deer erythrocytes as previously described (Malandrin et al., 2010). One bovine and two fallow deer, free of *Babesia*, were used as blood donors and kept respectively at the Nouzilly experimental station (cattle) or at the Veterinary School of Nantes (fallow deer) and fed ad libitum. The erythrocytes used in the culture medium were prepared from donor blood, as already described (Malandrin et al., 2004).

Cultures were prepared at 2.5 % haematocrit in RPMI 1640 supplemented with heat inactivated Fetal Calf Serum at a concentration of 20% (Lonza, Belgium), either in 96-well or 24-well plates, or in 25 or 75 cm² flasks with respective volumes of 150 µl, 2, 10 and 40 ml. Gentamicin and Amphotericin B were added at final concentrations of 50 µg/ml and 2.5 µg/ml respectively to avoid fungal and bacterial development. The cultures were left in a humidified 6 % CO₂ atmosphere at 37°C. Parasites developing in the cultures were detected and quantified on thin blood smears subsequently stained with MGG (May-Grünwald-Giemsa, DifQuick, Coper).

B. divergens Rouen 87 and Bob2, and *B. capreoli* 2801 and 2770 were cloned by limiting dilution method in sheep, cattle, roe deer and fallow deer erythrocytes respectively. The cloned cell lines obtained were named Rouen 87 F5, Bob2A, 2801 F10 and 2770 F6.

2.3. Extraction of DNA, *B. capreoli* and *B. divergens* merozoite surface gene *Bd37* amplification and polymorphism analysis

When parasitemia reached about 10%, the cultures were centrifuged at 1200 g for 10 min, washed with PBS and the erythrocyte pellet frozen in an equal amount of PBS. Genomic DNA was purified from parasitized red blood cells using the Promega Wizard genomic DNA purification kit (Promega, France). Primers specific to *Bd37* (Bd37-9 and Bd37-10 in table 1) (Haddj-Kaddour *et al.*, 2007) were used to amplify the *Bd37* gene from *B. divergens* and to attempt to amplify a homologous gene in *B. capreoli*. The PCR mix was prepared in a final volume of 50 µl of 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), with 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1 U Eurobiotaq® DNA polymerase (Eurobio, France) and 100 ng of the genomic DNA extracted from parasitized cultures. The amplification conditions for 35 cycles were denaturation for 5 min at 94°C, annealing for 30 s at 58°C and elongation for 1 min at 72°C, completed with a final 10 min elongation step at 72°C. The PCR products were separated and visualized by gel electrophoresis through a 1% ethidium bromide-stained agarose gel. The polymorphism of the amplified PCR products was then analyzed by separately performing enzymatic digestions with *RsaI* and *BglII* as previously described for *B. divergens* (Haddj-Kaddour *et al.*, 2007). A 10 µl volume of each PCR product was digested with each enzyme (9U) in the appropriate buffer for 3 hrs at 37°C. The restriction fragments were resolved in 2% ethidium bromide-stained agarose gel. Sequencing of the PCR products was performed on both strands directly from the PCR amplification products (Sequencing Platform of BioGenOuest® – Nantes – France). Partial sequences (472 bp) were obtained for 6 *B. capreoli* isolates (2745, 2770, 2787, 2801, 2807, 2820). ClustalW software (http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/clustalW_in.pl) was used to generate multiple alignment and CLC (<http://www.elcbio.com/index.php>) or BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) were used to produce a visual output of the resulting alignments and to calculate the nucleotide and amino acid sequence identities.

2.4. Sequencing of the full length *Bd37* ortholog in *B. capreoli*

RACE-PCR was used to obtain the full sequence of *Bd37* ortholog for two *B. capreoli* clonal lines (2801 F10 and 2770 F6). Total RNA was isolated from cultures with 15% parasitemia

using TRIzol LS Reagent (Invitrogen) and chloroform extraction, and reverse transcribed into DNA according to the guideline of the manufacturer. The inverse primers (Bcp37/41-inv down 5 and up 5) designed from the partial amplification product sequences were coupled with primers supplied by the manufacturer (respectively GeneRacer 5' and 3' in the RACE Ready cDNA Kit, Invitrogen) to amplify both ends of the sequences (table 1). The amplified products were subcloned into PCR4-TOPO vector (TOPO TA cloning kit for sequencing, Invitrogen). The constructs were maintained in the TOP10 *Escherichia coli* strain (Invitrogen) and then sequenced on both strands.

The presence and location of potential introns was controlled by RT-PCR and by sequencing the amplification products using primers Bcp37/41 up and down (table 1).

3. Results and discussion

3.1. PCR amplification of a putative ortholog of the merozoite surface protein coding gene Bd37 in *B. capreoli*

To amplify by PCR a putative ortholog of *Bd37* in *B. capreoli*, we selected the primers Bd37-9 and Bd37-10 (table 1) able to amplify a 900 bp fragment of the *Bd37* gene from all the 14 *B. divergens* isolates tested so far (Hadj-Kaddour et al., 2007).

Table 1
Nucleotide sequence of PCR primers used for amplification and sequencing of *B. capreoli* *Bcp37/41* genes.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Reference
Bd37-9	ATGAAAACCAGTAAGATTCTCAACAC	Hadj-Kaddour et al., 2007
Bd37-10	GCCGTATAGCAAATCCATCAT	Hadj-Kaddour et al., 2007
Bcp37-inv up 5	CATCATGGTAACAAGGATGAAAGTCGGG	This study
Bcp37-inv down 5	CACGCTGATCCTTCAGCTCCTTACG	This study
GeneRacer 5'	GCAGAGGACACUGACAUGGACUGA	Invitrogen
GeneRacer 3'	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	Invitrogen
Bcp37/41 up	ATGAAAACMACYAAGATTCTCAACAC	This study
Bcp37/41 down	CTGYWCACYTAGAACATTGACACAATGA	This study

They thus recognized a conserved region of this gene that might be similar in the *B. capreoli* ortholog of *Bd37*. Positive controls were prepared with *B. divergens* genomic DNA prepared from 3 different isolates and amplification was tested on DNA from 8 *B. capreoli* isolates. A single fragment of about 900 bp in size (as expected with these primers) was amplified from each of the 3 *B. divergens* isolates (Figure 1A, lanes 1 to 3). A single PCR product was also obtained for each of the 8 *B. capreoli* isolates tested, with a size ranging from 900 bp to 1100 bp (5 of them are shown in Figure 1A, lanes 4 to 8).

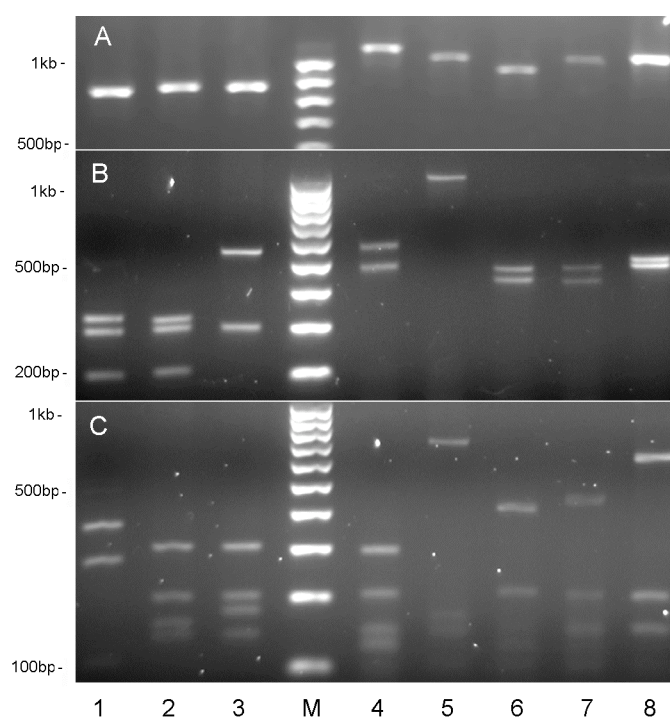


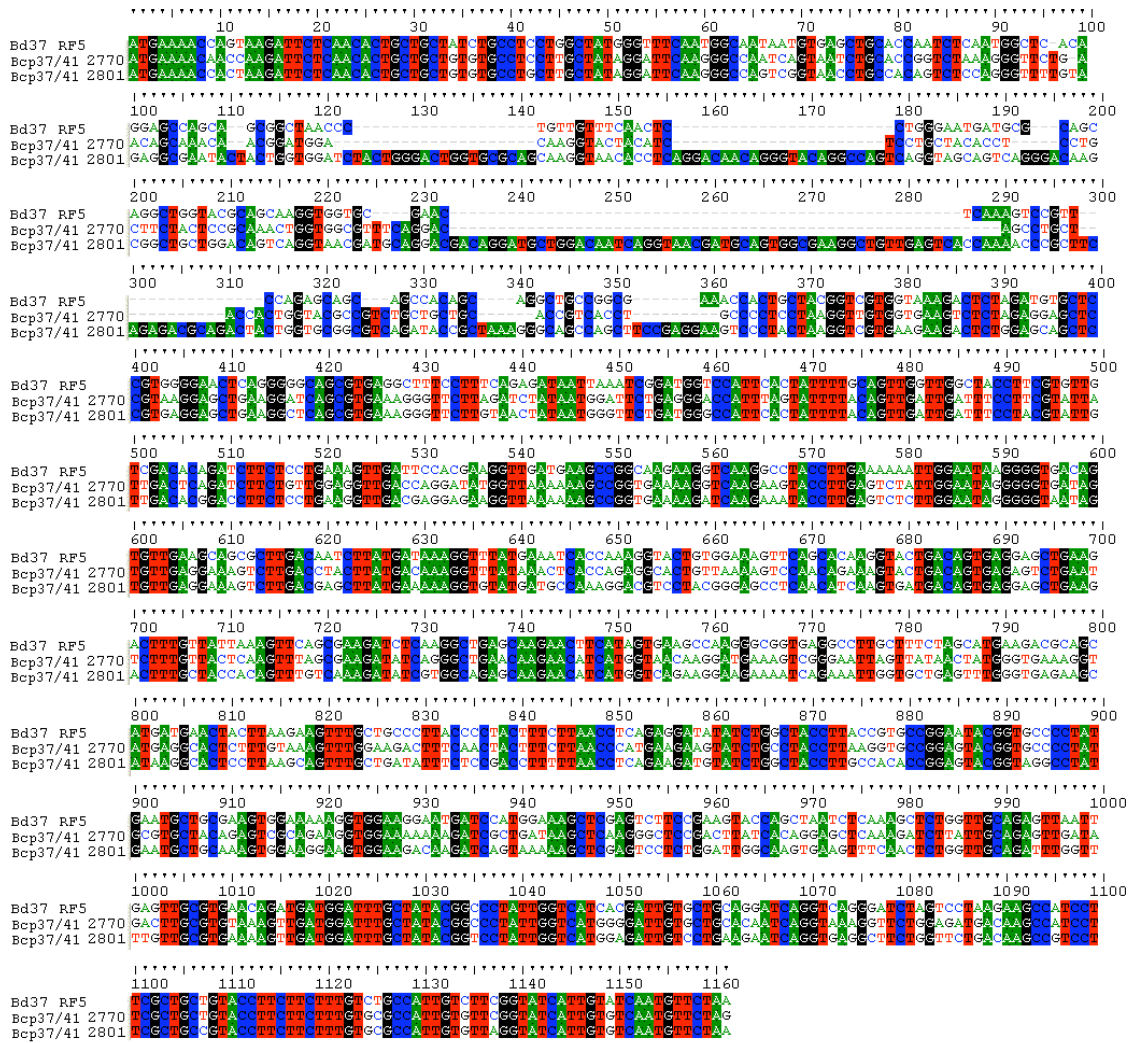
Figure 1 : (A) Partial amplification products of the *B. divergens* *Bd37* gene (lanes 1 to 3) and of a putative orthologous gene in *B. capreoli* (lanes 4 to 8). Restriction fragment length polymorphism-PCR of the partial *Bd37* amplification products for *B. divergens* (lanes 1 to 3) and of *B. capreoli* putative ortholog (lanes 4 to 8) with *Bgl*II (B) and *Rsa*I (C). 1, 2210A; 2, Bob2A ; 3, C139 ; M : 100 bp DNA molecular mass marker (Eurobio); 4, 2745 ; 5, 2801 ; 6, 2806 ; 7, 2807 ; 8, 3085 ; M.

A partial sequence was first obtained from the amplification product of *B. capreoli* 2770. A Blast positive match was obtained with the *Bd37* sequence of *B. divergens* isolate 6303 E (Genbank accession number AJ507803), with a nucleotide identity of 74% calculated over a compared region of 641 pb.

3.2. Identification of Bcp37/41 in *B. capreoli* 2770 F6 and 2801 F10, an ortholog of *B. divergens* GPI-anchor merozoite surface antigen Bd37

Complete sequences of the putative ortholog of *Bd37* were obtained from two *B. capreoli* clones (2770 F6 and 2801 F10), by RACE-PCR using internal primers (Bcp37-inv up 5 and Bcp37-inv down 5, table 1) designed from the above partial sequence. These clones were selected as presenting high size differences of their partial amplification products (900 bp and 1035 bp respectively) and originating from different geographical origin. The open reading frames in both sequences were 1026 bp and 1161 bp for 2770 F6 and 2801 F10 respectively (Genbank accession numbers GQ246177 and GQ246178). The complete gene of *B. capreoli* 2770 F6 was exactly the same length as the *Bd37* sequence published for the Rouen 87 isolate. Comparison of the *Bcp37/41* cDNA lengths and sequences obtained by RT-PCR with those of the PCR-amplified whole genes indicated the absence of introns in the genes of both *B. capreoli* clones (data not shown), as also described for Bd37 (Delbecq et al., 2002).

Both Bcp37/41 complete sequences blasted only with the 6 Bd37 sequences deposited in Genbank (accession numbers AJ509155 to AJ509158, AJ422214 and AJ507803). Complete nucleotide sequence alignments between *Bd37* of Rouen 87 and *Bcp37/41* of 2770 F6 and 2801 F10 are given as supplementary data (Appendix A). Amino acid alignments are shown in Figure 2 (isolate 6303 E was added to demonstrate the organisational conservation among Bd37 sequences). When analyzing the whole sequence, the nucleotide identities between Rouen 87 and the *B. capreoli* clones 2770 F6 and 2801 F10 were 70.2% and 59.5%, with amino acid identities of 54.7% and 50.3%, while 68.0% and 54.9% were obtained between *Bcp37/41* sequences. The higher similarities obtained between 2770 F6 and Rouen 87 sequences than with 2801 F10 can be explained by the longest sequence of 2801 F10 Bcp37/41 compared to the two others. The same comparisons performed avoiding the N-terminal extremely variable part of the gene (nt 243 to 714 on Rouen 87 sequence presented on figure 3) indicated higher similarities between *B. capreoli* Bcp37/41 sequences (77.5%/62.4% representing nucleotide/amino acid identities) than between Bd37 from Rouen 87 and Bcp37/41 of 2770 F6 (69.7%/54.8%) and 2801 F10 (68.2%/54.8%).



Appendix A : Alignment of 3 complete nucleotide sequences of Bcp37/41 proteins from *B. capreoli* 2801 F10 (Genbank GQ246177), 2770 F6 (GQ246178) and Bd37 protein from *B. divergens* Rouen 87 (AJ422214).

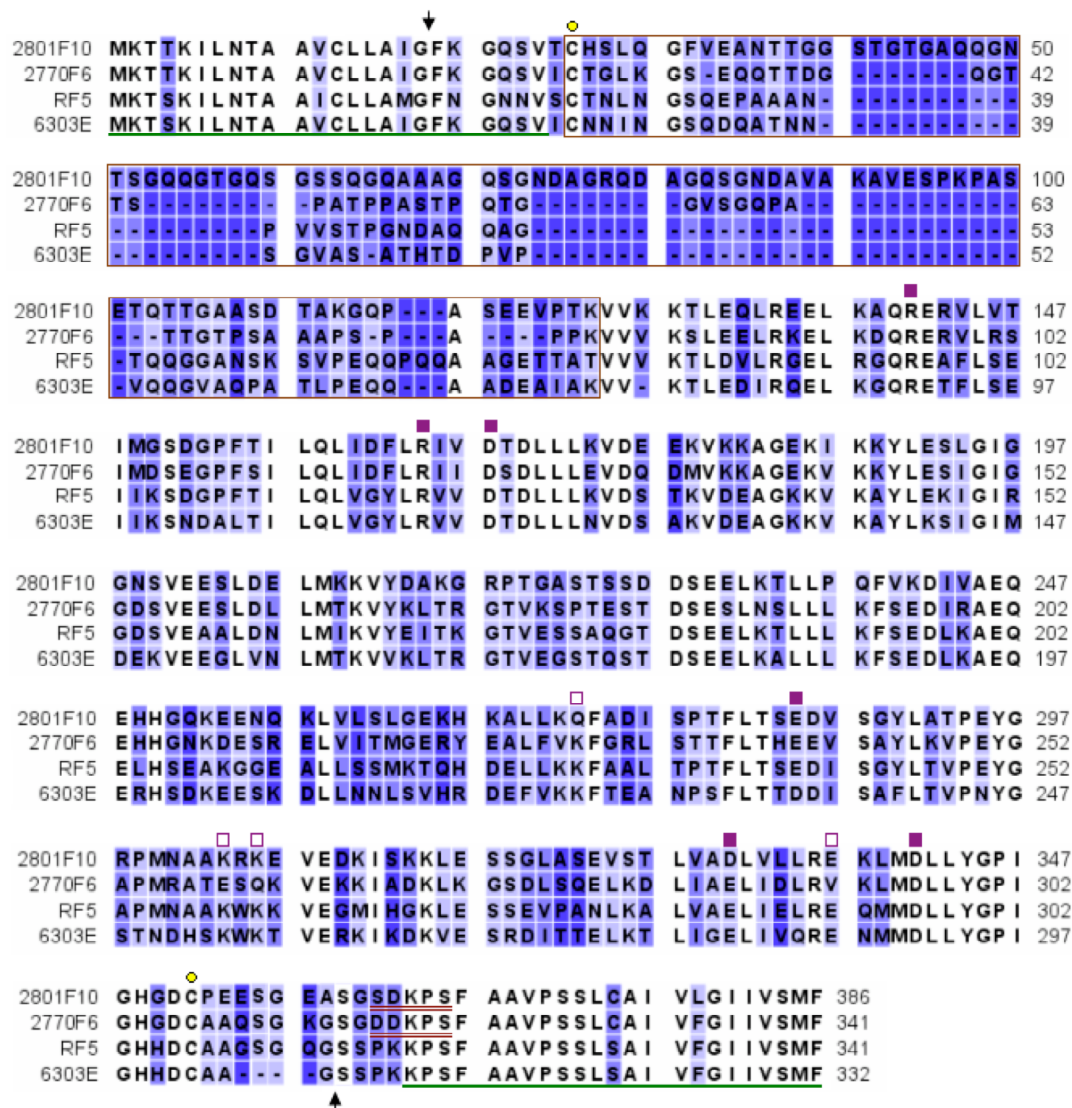


Figure 2 : Alignment and analysis of the predicted amino acid sequence of Bcp37/41 proteins from *B. capreoli* 2801 F10 (Genbank GQ246177), 2770 F6 (GQ246178) and Bd37 protein from *B. divergens* RF5 (AJ422214), 6303E (AJ507803) isolates. The degree of conservation is represented by a color gradient from white (strictly conserved), to light blue (moderately conserved) and dark blue (not conserved). Arrows indicate cleavage site of the N-terminal signal peptide and the C-terminal GPI-anchoring signal. The conserved cysteines involved in a disulfide bond are marked by yellow ellipses. The conserved C- and N- terminal extremities are underlined. The high polymorphism area is indicated by a brown frame. The identical or conserved residues involved in salt bridges formation are marked with purple squares, the non-conserved ones with hollow purple squares. The five charged amino acids or proline are double underlined.

As already found by Delbecq et al. (2002) and Hadj-Kadour et al. (2007), no significant homologies with described proteins (other than Bd37) were obtained by BLAST analysis. This is thus the first identification of a *Bd37* ortholog among *Babesia* species. It confirms the

phylogenetic relatedness of *B. capreoli* and *B. divergens*, already demonstrated by 18S rDNA sequencing (99.83% nucleotide identity) (Malandrin et al., 2010).

3.2. Conservation of gene organization and main functional properties between Bd37 and Bcp37/41

Bcp37/41 genes of 2770 F6 and 2801 F10 have no introns and code respectively for proteins with predicted molecular weights of 36.8 kDa and 40.8 kDa, and isoelectric points of 5.38 and 5.18, compared to Bd37 isoelectric point of 5.19 for Rouen 87 (Delbecq et al., 2002). The overall gene organization was conserved with two hydrophobic highly conserved extremities corresponding to the N-terminal signal peptide and the C-terminal GPI-anchoring signal described for Bd37 (underlined on figure 2), and a central more divergent portion (Delbecq et al., 2008). The cleavage site of the signal peptide was conserved between G18 and F19. We predict the omega residue G314 for 2770 F6 and A359 for 2801 F10 with a respective GPI cleavage/attachment site of GSG and ASG respectively, followed by a stretch of 5 charged amino acids or proline (DDKPS and SDKPS, respectively double underlined on figure 3). Thus the sequence of the GPI cleavage site differs slightly between the two species, the GSS PPKPS sequence being conserved in most *B. divergens* isolates (Hadj-Kaddour et al, 2007). The highest level of polymorphism between the two *B. capreoli* Bcp37/41 and Bd37 sequences was observed in the N-terminal part, just after the N-terminal hydrophobic signal peptide, between amino acids Cys26 to Val80 of the Rouen 87 sequence. This region is characterized by insertion/deletion events and amino acids substitutions and varied in length from 54 to 98 residues in the four sequences compared. Polymorphism in the remaining part of the molecule (Val80 to Ser311 of either Rouen87 or 2770 F6 sequence) is restricted to amino acids substitutions. The two conserved cysteines (indicated by ellipses) described in the Bd37 sequence (Cys26 and Cys307 of Rouen 87) and involved in a disulfide bridge are also conserved in Bcp37/41. Some of the residues (6/10) involved in the salt bridge formations described for Rouen87 Bd37 are also identical (different residues with similar charges) or conserved (full purple squares on figure 2) (Delbecq et al., 2008).

In conclusion, the typical features of the *Bd37* gene were identified on both *Bcp37/41* genes: a conserved typical N-terminal hydrophobic signal peptide, a typical C-terminal GPI-anchoring signal and a central variable portion characterized by amino acids insertions/deletions (length differences of 44 amino acids in the most variable N-terminal parts) and substitutions (Delbecq et al., 2002). The presence of the C-terminal GPI-anchoring signal strongly suggests that the protein is also present on the surface of *B. capreoli* merozoites. This could be verified by the use of a Bcp37/41 specific antibody. The unstructured N-terminal part of the molecule is suspected to be involved in the immune escape mechanism of *B. divergens* (Delbecq et al., 2008). The polymorphism present in the same part of the molecule in *B. capreoli* Bcp37/41 suggests a similar function of this protein in *B. capreoli*. However, the higher variability in this region for *B. capreoli* might imply different or stronger selection pressure from roe deer immune system. The structure of Bd37 has been determined (Delbecq et al., 2008), and important structural features are also conserved in Bcp37/41: position of the cysteines involved in disulfide bridges as well as charged residues involved in salt bridges tying subdomains of the protein together. The role of Bd37 in the initial poorly specific, electrostatic interactions with the host cell, the erythrocyte, is strongly suspected. Replacement of one of the salt bridge-forming residues (mutant R83A) results in a total loss of interaction with the erythrocyte, whereas replacement of its neighbour (Q82A) results in a substantial loss of adhesion (Delbecq et al., 2008). These residues are perfectly conserved in Bcp37/41, and thus a similar role in adhesion of this protein to the erythrocyte surface can also be suspected in *B. capreoli*. From these data, we concluded that Bd37 and Bcp37/41 are not only orthologs but that they most probably fulfil the same functions, that need to be confirmed by further functional investigations on Bcp37/41.

3.3. Polymorphism of the *B. capreoli* Bd37 ortholog

Genetic polymorphism of *Bd37* is a recognized feature of *B. divergens* isolates (Hadj-Kaddour et al., 2007). We therefore applied for *B. capreoli* the same PCR-RFLP approach to *Bcp37/41* partial amplification products in order to explore the polymorphism of this *Bd37* ortholog. All the amplified fragments from the *B. capreoli* isolates were digested with *RsaI* (Figure 1C) and all except one (from isolate 2801) were digested with *BglII* (Figure 1B). Each randomly tested isolate exhibited a distinct digestion pattern with these 2 enzymes (5 of them

presented on Figure 1 B and C, lanes 4 to 8), different from any described here (Figure 1B and C, lanes 1 to 3) or published for *B. divergens* isolates (Hadj-Kaddour et al., 2007). An undescribed digestion pattern was obtained for isolate C139 of *B. divergens*, (Figure 1B and C, lane 3), adding a new group to the 5 clades already published (Hadj-Kaddour et al., 2007). PCR-RFLP applied to this merozoite surface protein coding gene could thus provide a rapid tool to discriminate the two closely related species *B. divergens* and *B. capreoli*, evaluate the molecular intra-specific diversity and could be used in epidemiological studies.

Partial sequences (about 500 bp) were obtained for 4 other *B. capreoli* isolates (2745, 2787, 2807 and 2820). These partial sequences were deposited under the respective Genbank accession numbers HM156207 to HM156210. They were aligned with *Bd37* sequence from *B. divergens* isolate Rouen 87 (AJ422214), Weybridge (AJ509155), Y5 (AJ509157), 1705A (AJ509156), and 6303E (AJ507803). Alignments of the 6 *B. capreoli* sequences with *B. divergens* Rouen 87 are shown in Figure 3. On this region, 31.6% (149/472) of the nucleotides are conserved for the 12 sequences compared, 66.3% (313/472) being conserved among the 6 *B. divergens* sequences compared, and 45.3% (214/472) among the 6 *B. capreoli* sequences (white background). These results indicate a greater variability for this gene among *B. capreoli* compared to *B. divergens*. Few residues (4/472, 0.8%) were conserved within each species but differed between species (underlined on Rouen sequence).

Rouen GGTAAAGACT CTAGATGTGC TCCGTGGGA ACTCAGGGG CAGCGTGAGG CTTCCTTC AGAGATAATT 70
2770 GGTGAAGTCT CTAGAGGAGC TCCGTAAGGA GCTGAAGGAT CAGCGTGAAA GGGTTCTTAG ATCTATAATG 70
2801 GAAGAAGACT CTGGAGCAGC TCCGTGAGGA GCTGAAGGCT CAGCGTGAAA GGGTTCTTGT AACTATAATG 70
2820 GGTGAAGTCT CTAGAGGAGC TCCGTAAGGA GCTGAAGGAT CAGCGTGAAA GGGTTCTTAG ATCTATAATG 70
2745 GAAAAAACC CTGGATGAA TGCCTAAAGA AATGCGTACC GAACGTGAAA AAGTGCTGAG CACCATTATG 70
2787 GAAGAAGACT CTGGAGCAGC TCCGTAATGA AATGAGGGGT CAGCGTGAAA AGTTCTTAA AACTATAATT 70
2807 GGTGAAGTCT CTAGAGGAGC TCCGTAAGGA GCTGAAGGAT CAGCGTGAAA GGGTTCTTAG ATCTATAATG 70

Rouen AAATCGGATG GTCCATTAC TATTTTGCAG TTGGTTGGCT ACCTTCGTGT TGTCGACACA GATCTTCTCC 140
2770 GATTCTGAGG GACCATTAG TATTTTACAG TTGATTGATT TCCTTCGTAT TATTGACTCA GATCTTCTGT 140
2801 GGTCTGATG GGCCATTAC TATTTTACAG TTGATTGATT TCCTACGTAT TGTTGACACG GACCTTCTCC 140
2820 GATTCTGAGG GACCATTAG TATTTTACAG TTGATTGATT TCCTTCGTAT TATTGACTCA GATCTTCTGT 140
2745 GATAGCGATG GCCCGTATAC CATTCTGCAG CTGATTGATT ATCTGCGTAT TGTGAACACC GATCTGCTGC 140
2787 GACTYTATG GGCCGTTGAC TATTTTACAG TTGATTGATT ACCTTCGTAT TATTGAGACA GATCTTCTCC 140
2807 GATTCTGATG GACCATTGG TATTTTACAG TTGATTGATT TCCTTCGTAT TATTGACTCA GATCTTCTGT 140

Rouen TGAAAGTTGA TTCCACGAAG GTTGATGAAG CCGGCAAGAA GGCAAGGCC TACCTTGAAA AAATTGGAAT 210
2770 TGGAGGTTGA CCAGGATATG GTTAAAAAAG CCGGTGAAAA GGCAAGAAAG TACCTTGAGT CTATTGGAAT 210
2801 TGAAGGTTGA CGAGGAGAAG GTTAAAAAAG CCGGTGAAAA GATCAAGAAA TACCTTGAGT CTCTTGAAT 210
2820 TGGAGGTTGA CCAGGATATG GTTAAAAAAG CCGGTGAAAA GGCAAGAAAG TACCTTGAGT CTATTGGAAT 210
2745 TGAAAGTGA TCCGATATG GTGAAAAAAG CCGGCGAAAA AGTAAAAAA TATCTGAAA GCATTGGCAT 210
2787 TGAAGTCTGA CCAGGAATTG GTTAAAAAAG CCGGAGAAAT GGCAAGGCC TATCTGCCA CTCTTGAAT 210
2807 TGGAGGTTGA CCAGGATATG GTTAAAAAAG CCGGTGAAAA GGCAAGAAA TACCTTGAGT CTATTGGAAT 210

Rouen AAGGGGTGAC AGTGTTGAAG CAGCGCTTGA CAATCTTATG ATAAAGGTTT ATGAAATCAC CAAAGGACT 280
2770 AGGGGTGAT AGTGTTGAGG AAAGTCTTGA CCTACTTATG ACAAAGGTTT ATAACTCAC CAGAGGCACT 280
2801 AGGGGTAAAT AGTGTTGAGG AAAGTCTTGA CGAGCTTATG AAAAAAGTGT ATGATGCCA AGGACGTCTT 280
2820 AGGGGTGAT AGTGTTGAGG AAAGTCTTGA CCTACTTATG ACAAAGGTTT ATAACTCAC CAGAGGCACT 280
2745 TACCGCGAT AGCGTGAAG TGAGCCTGGA TAACTGATG ACCAAAGTGT ATGATATTAC CCGTGGCACC 280
2787 AACGGTGAG AGTGTTGAGG ATTGTCTTGA CAAGCTTATG AAAAAAGTGT ATGAATTAAC CAGAGGACT 280
2807 AGGGGTGGT AGTGTTGAGG AAAGTCTTGA CCTACTTATG ACAAAGGTTT ATAACTCAC CAAAGGCACT 280

Rouen GTGAAAAGTT CAGCACAAGG TACTGACAGT GAGGAGCTGA AGACTTTGTT ATTAAGTTC AGCGAAGATC 350
2770 GTTAAAAGTC CAACAGAAAG TACTGACAGT GAGAGTCTGA ATTCTTTGTT ACTCAAGTTT AGCGAAGATA 350
2801 ACGGGAGCCT CAACATCAAG TGATGACAGT GAGGAGCTGA AGACTTTGCT ACCACAGTTT GTCAAAGATA 350
2820 GTTAAAAGTC CAACAGAAAG TACTGACAGT GAGAGTCTGA ATTCTTTGTT ACTCAAGTTT AGCGAAGATA 350
2745 GTGACCAAAC CGAAAGATAG CACCGATAGC GAAAGCCTGA CCAGCCTGCT GCTGAAATTT AGCGAAGAAC 350
2787 ATGACAGGTC CAACAGAAAA GGCTGAAAGT GATAAGTTA CATCTCAGTT ACTAAAGTTC AGTGCTGATA 350
2807 GTTAAAAGTC CAGCAGAGAG TACTGACAGT GAGAGTCTGA CTCTTTGTT ACTCAAGTTT AGCGAAGATA 350

```

Rouen TCAAGGCTGA GCAAGAACTT CATAGTGAAG CCAAGGGCGG TGAGGCCTTG CTTTCTAGCA TGAAGACGCA 420
2770 TCAGGGCTGA ACAAGAACAT CATGGTAACA AGGATGAAAG TCGGGAATTA GTTATAACTA TGGGTGAAAG 420
2801 TCGTGGCAGA GCAAGAACAT CATGGTCAGA AGGAAGAAA TCAGAAATTG GTGCTGAGTT TGGGTGAGAA 420
2820 TCAGGGCTGA ACAAGAACAT CATGGTAACA AGGATGAAAG TCGGGAATTA GTTATAACTA TGGGTGAAAG 420
2745 TGAAAACCGA ACAGGAACAT CATGGCAAAA AAGAAGAAAG CCGTAACTG TTTGAAACCA TGGGCGAAAA 420
2787 TCAGGGCTGA GCAAGAACAT CATGGTGGGA AGCAGGAAAG TCGGGAATTG GTGTTGAATT TGGGTACCAA 420
2807 TCAGGGCTGA ACAAGAACAT CATGGTAACA AGGATGAAAG TAAAGAATTA GTTATAACAT TGGGTAAAAG 420

Rouen GCATGATGAA CTACTTAAGA AGTTTGCTGC CCTTACCCT ACTTTCTTAA CC 472
2770 GTATGAGGCA CTCTTTGTAA AGTTTTGGAAG ACTTTCAACT ACTTTCTTAA CC 472
2801 GCATAAGGCA CTCCTTAAGC AGTTTTGCTGA TATTTCTCCG ACCTTTTTAA CC 472
2820 GTATGAGGCA CTCTTTGTAA AGTTTTGGAAC ACTTTCAACT ACTTTCTTAA CC 472
2745 ATTTGAAAAA CTGGTGGAAA AACTGCATGA TGTGGCGAAA GATTTCTGA CC 472
2787 GCATAAGGAA CTCCTTAAGA AGCTTTAAAGA AGCTGACCCT AGTTTCTTAA CC 472
2807 GTATGAGGAA CTCTCTGCAA AGTTTTCTAAA ACTTCCCACT ACTTTCTTAA CC 472

```

Figure 3: Alignment of 6 partial nucleotide sequences of *B. capreoli* *Bcp37/41* with *B. divergens* Rouen 87 *Bd37* (from nt 243 to 714). Conserved nucleotides within each species are represented in a white background compared to a grey background for the variable ones. The alignment of the 6 *B. divergens* sequences is not shown but the conservation of each nucleotide is indicated on Rouen 87 sequence with the white and grey backgrounds. The 4 nucleotides conserved within each species but different between them are underlined.

The comparative analysis of *Bd37* and *Bcp37/41* sequences from more isolates could give invaluable informations on the phylogenetic relatedness between these two species and on the discriminating value of this marker at the species level. The development of a species-specific diagnostic tool using either antibody-based markers or PCR would represent an additional tool extremely valuable for epidemiological purposes. However, for both approaches, such a development will have to take into account the intraspecific variability of each species for this merozoite surface antigen coding gene.

Aknowledgments

This work was supported by research funds from the Institut National de la Recherche Agronomique, the Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes and the AIP Bioressources grant for sequencing funds (with O. Plantard as coordinator). Y. Sun's PhD thesis is financed by Region Pays de Loire. We are grateful to Claire Becker for her help with the RNA extraction and RACE PCR. Thanks are also due to the working group TMT (Ticks and tick-transmitted diseases) of the French network of scientists working on evolution and sustainable interactions (REID), and to Suzanne Bastian for her critical reading of the manuscript.

References

- Brasseur, P., Lecoublet, S., Kapel, N., Favennec, L., Ballet, J.J., 1998. In vitro evaluation of drug susceptibilities of *Babesia divergens* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 818-820.
- Cacciò, S., Cammà, C., Onuma, M., Severini, C., 2000. The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int. J. Parasitol.* 30, 1181-1185.
- Cancrini, G., Gabrielli, S., Lori, A., Grifoni, G., Calderini, P., 2008. Morphology and genetics of a *Babesia* isolate from *Capreolus capreolus*. *J. Wildlife Dis.* 44, 168-171.
- Carcy, B., Précigout, E., Valentin, A., Gorenflot, A., Reese, R.T., Schrével, J., 1991. Heat shock response of *Babesia divergens* and identification of the hsp70 as an immunodominant early antigen during ox, gerbil and human babesiosis. *Biol. Cell.* 72, 93-102.
- Carcy, B., Précigout, E., Valentin, A., Gorenflot, A., Schrevel, J., 1995. A 37-kilodalton glycoprotein of *Babesia divergens* is a major component of a protective fraction containing low-molecular-mass culture-derived exoantigens. *Infect. Immun.* 63, 811-817.
- Delbecq, S., Précigout, E., Vallet, A., Carcy, B., Schettters, T.P., Gorenflot, A., 2002. *Babesia divergens*: cloning and biochemical characterization of Bd37. *Parasitology* 125, 305-312.
- Delbecq, S., Précigout, E., Schettters, T., Gorenflot, A., 2003. *Babesia divergens*: cloning of a Ran binding protein 1 homologue. *Vet Parasitol.* 115, 205-211.
- Delbecq, S., Auguin, D., Yang, Y.S., Löhr, F., Arold, S., Schettters, T., Précigout, E., Gorenflot,

- A., Roumestand, C., 2008. The solution structure of the adhesion protein Bd37 from *Babesia divergens* reveals structural homology with eukaryotic proteins involved in membrane trafficking. *J. Mol. Biol.* 375, 409-424.
- Duh, D., Petrovec, M., Bidovec, A., Avsic-Zupanc, T., 2005. Cervids as babesiae hosts, Slovenia. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1121–1123.
- Enigk, K., Friedhoff, K., 1962a. *Babesia capreoli* n. sp. beim Reh (*Capreolus capreolus* L.). *Zeitschr. Tropenmed. Parasitol.* 13, 8-20.
- Enigk, K., Friedhoff, K., 1962b. The host specificity of *Babesia divergens* (M'Fadyean and Stockman, 1911). *Zeitschr. Parasitenk.* 21, 238-256.
- Garcia-Sanmartin, J., Aurtenetxe, O., Barral, M., Marco, I., Lavin, S., Garcia-Perez, A.L., Hurtado, A., 2007. Molecular detection and characterization of piroplasms infecting cervids and chamois in Northern Spain. *Parasitology* 134, 391–398.
- Gorenflot, A., Brasseur, P., Précigout, E., L'Hostis, M., Marchand, A., Schrevel, J., 1991. Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: ox, gerbil, man. *Parasitol. Res.* 77, 3-12.
- Gray, J.S., 2006. Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *Int. J. Med. Microbiol.* 296 (Suppl 40), 131–136.
- Gray, J.S., Murphy, T.M., Taylor, S.M., Blewett, D.A., Harrington, R., 1990. Comparative morphological and cross transmission studies with bovine and deer babesias in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 9, 185-193.
- Gray, J.S., Murphy, T.M., Waldrup, K.A., Wagner, G.G., Blewett, D.A., Harrington, R., 1991. Comparative studies of *Babesia* spp. from white-tailed and sika deer. *J. Wildlife Dis.* 27, 86–91.
- Hadj-Kaddour, K., Carcy, B., Vallet, A., Randazzo, S., Delbecq, S., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., Précigout, E., 2007. Recombinant protein Bd37 protected gerbils against heterologous challenges with isolates of *Babesia divergens* polymorphic for the bd37 gene. *Parasitology* 134, 187-196.
- Hilpertshauser, H., Deplazes, P., Schnyder, M., Gern, L., Mathis, A., 2006. *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6503-6507.
- Hoby, S., Mathis, A., Doherr, M.G., Robert, N., Ryser-Degiorgis, M.P., 2009. *Babesia capreoli*

infections in alpine chamois (*Rupicapra R. rupicapra*), roe deer (*Capreolus C. capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Switzerland. J. Wildl. Dis. 45, 748-763.

Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A., Gray, J.S., 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. Int. J. Parasitol. 38, 1219-1237.

Joyner, L.P., Davies, S.F., Kendall, S.B., 1963. The experimental transmission of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus*. Exp. Parasitol. 14, 367-373.

Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. Int. J. Parasitol. 30, 1323-1337.

Langton, C., Gray, J.S., Waters, P.F., Holman, P.J., 2003. Naturally acquired babesiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) herd in Great Britain. Parasitol. Res. 89, 194-198.

Lewis, D., Williams, H., 1979. Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*. Nature, 278, 170.

L'Hostis, M., Chauvin, A., Valentin, A., Marchand, A., Gorenflot, A., 1995. Large-scale survey of *Babesia divergens* bovine babesiosis in France. Vet. Rec. 136, 36-38.

Lobo, C.A., 2005. *Babesia divergens* and *Plasmodium falciparum* use common receptors, glycophorins A and B, to invade the human red blood cell. Infect. Immun. 73, 649-651.

Malandrin, L., L'Hostis, M., Chauvin, A., 2004. Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using in vitro culture. Vet. Res. 35, 131-139.

Malandrin, L., Jouglin, M., Sun, Y., Brisseau N., Chauvin, A., 2010. Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterization and differentiation from *B. divergens*. Int. J. Parasitol. 40, 277-284.

Montero, E., Gonzalez, L.M., Rodriguez, M., Oksov, Y., Blackman, M.J., Lobo, C.A., 2006. A conserved subtilisin protease identified in *Babesia divergens* merozoites. J. Biol. Chem. 281, 35717-35726.

Montero, E., Rodriguez, M., Gonzalez, L.M., Lobo, C.A., 2008. *Babesia divergens*: identification and characterization of BdHSP-20, a small heat shock protein. Exp Parasitol. 119, 238-245.

Nikol'skii, S.N., Pozov, S.A., 1972. *Ixodes ricinus* ticks as carriers of *Babesia capreoli* in the roe deer. Veterinaryia 4, 62.

- Nilsson, O., Nordkvist, M., Rydén, L., 1965. Experimental *Babesia divergens* infection in reindeer (*Rangifer tarandus*). Acta Vet. Scand. 6, 353-359.
- Précigout, E., Delbecq, S., Vallet, A., Carcy, B., Camillieri, S., Hadj-Kaddour, K., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., 2004. Association between sequence polymorphism in an epitope of *Babesia divergens* Bd37 exoantigen and protection induced by passive transfer. Int. J. Parasitol. 34, 585-593.
- Sawczuk, M., Maciejewska, A., Adamska, M., Skotarczak, B., 2005. Roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) as a reservoir of protozoans from *Babesia* and *Theileria* genus in northwestern Poland. Wiad. Parazytol. 51, 243–247 (in Polish, with English abstract).
- Schmid, N., Deplazes, P., Hoby, S., Ryser-Degiorgis, M.P., Edelhofer, R., Mathis, A., 2008. *Babesia divergens*-like organisms from free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) and roe deer (*Capreolus c. capreolus*) are distinct from *B. divergens* of cattle origin - an epidemiological and molecular genetic investigation. Vet. Parasitol. 154,14-20.
- Tampieri, M.P., Galuppi, R., Bonoli, C., Cancrini, G., Moretti, A., Pietrobelli, M., 2008. Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. Vector Borne Zoonotic Dis. 8, 667-674.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., Gray, J.S., 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin. Microbiol. Rev. 16, 622–636.

Article N° 3 : New cellular and molecular insights into the process of *Babesia divergens* invasion of bovine erythrocytes (Aspects cellulaires et moléculaires nouveaux du processus d'invasion des erythrocytes bovins par *Babesia divergens*)

Article soumis à Veterinary Research

Babesia divergens est un parasite Apicomplexe transmis par la tique *Ixodes ricinus* à son hôte vertébré le bovin chez qui se déroule la multiplication asexuée dans les érythrocytes. Les connaissances sur les aspects cellulaires et moléculaires de l'invasion de ces cellules hôtes par *B. divergens* est limité. Un test d'invasion efficace a été mis au point pour améliorer nos connaissances. Les parasites libérés par électroporation sont mis en contact avec les érythrocytes bovins dans un milieu synthétique (RPMI 1640 + 1mM CaCl₂). Une culture avec une parasitémie de 6 à 14% peut ainsi être obtenue. Après contact, les parasites extra-cellulaires peuvent être éliminés par séparation en gradient de Percoll afin de contrôler le temps laissé aux parasites pour envahir le GR, d'avoir un début de culture synchronisé et d'étudier la cinétique d'invasion.

Avec ce test, on a démontré que

- i). l'invasion érythrocytaire par *B. divergens* est un processus très rapide car 70% de parasites qui sont capables d'envahir le font en moins de 45 seconds,
- ii). tous les parasites capables d'envahir les hématies le font en 10 min maximum,
- iii). un érythrocyte peut être envahi par deux mérozoïtes,
- iv). malgré un début synchronisé, le développement de la population du parasite est hétérogène, ce qui se traduit par une perte progressive de synchronisation.

Les protéines récupérées dans le milieu d'invasion ont été analysées en utilisant les sérums d'animaux infectés expérimentalement par *B. divergens* et plusieurs protéines ont été reconnues. L'effet inhibiteur, dose-dépendant, de ces sérums sur l'invasion par *B. divergens* suggère que les protéines reconnues pourraient être impliquées dans le processus d'invasion. Des recherches plus poussées sont nécessaires pour leur caractérisation.

New cellular and molecular insights into the process of *Babesia divergens* invasion of bovine erythrocytes

Running head : *Babesia divergens* invasion process

Sun Y.^{a,b,c}, Moreau E.^{a,b,c}, Chauvin A.^{a,b,c}, Malandrin L.^{a,b,c}

a. ONIRIS, UMR1300, F-44307 Nantes, France.

b. INRA, F-44307 Nantes, France

c. Université Nantes Angers Le Mans, France.

Corresponding author - Yi Sun, INRA, ONIRIS, UMR1300, Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risques, BP 40706, F-44307 Nantes, France. Phone : +33 (0) 2 40 68 78 57 Fax : +33 (0) 2 40 68 77 51 - E-mail address : yi.sun@oniris-nantes.fr

Abstract

Babesia divergens is a tick-transmitted apicomplexan parasite for which asexual multiplication is restricted to the erythrocytes of its vertebrate hosts. Current knowledge of invasion of these target cells is limited. An efficient in vitro invasion assay was set up to gain access to this information. Parasites prepared from infected RBC, lysed by electroporation, and mixed with bovine RBC in a selected synthetic medium (RPMI 1640 supplemented with calcium) were able to establish subsequent cultures with parasitemia ranging from 6 to 14%. Free parasites remaining in the invasion medium could be eliminated by Percoll gradient and culture could be pursued with the freshly invaded erythrocytes. In this way, the invasion time window could be shortened to obtain a synchronised start of the culture or to study the kinetics of invasion. With this assay we demonstrated that 1) erythrocyte invasion by *B. divergens* is a rapid process since 70% of the invasion-competent parasites invaded the RBC in less than 45 seconds; 2) all invasion-competent parasites achieved invasion within 10 min of contact; 3) one erythrocyte could be invaded concomitantly by two merozoites; 4) despite a synchronous start, the parasite population evolved heterogeneously resulting in a progressive loss of synchronization. Western blot analysis of proteins collected from invasion medium were performed with sera from animals experimentally infected with *B. divergens* and highlighted several proteins. The dose-dependent, inhibitory effects of these sera on *B. divergens* invasion suggested that these proteins might be involved in the invasion process. Further investigations are required for their characterization.

Keywords : *B. divergens*, erythrocyte invasion, synchronization, kinetics of invasion, inhibition of invasion

1. Introduction

Babesia divergens is a tick-transmitted intra-erythrocytic apicomplexan parasite, which infects cattle and a wide variety of other mammals. Experimental or natural infections by *B. divergens* have been documented in gerbil, sheep, and reindeer [4, 19, 20, 31]. *B. divergens* has also been recognized, in the last 30 years, as a zoonotic agent in Europe [13, 14, 44].

Apicomplexan blood parasites differ in the range of cell types that they infect. *Plasmodium spp.* or *Theileria spp.* sporozoites first invade hepatocytes or lymphocytes, respectively, and then evolve into erythrocyte invasive merozoites [35]. In contrast, the sporozoite and the merozoite of *Babesia spp.*, two infectious forms of the parasite, directly invade the host erythrocyte where they multiply asexually [25]. It is obvious that inhibition of their multiplication, and especially the step of invasion, should prevent the disease. Molecules engaged in the invasion process or contributing to its regulation are proposed as promising drug targets. In addition, since both the sporozoite and merozoite of *Babesia* are infectious to RBC, the ligands expressed during erythrocyte invasion that they share might provide a common target for antibody-mediated inhibition of invasion.

The process of erythrocyte invasion by *B. divergens* is considered to be similar to that of *Plasmodium*. It is described as an initial recognition between zoite and host cell, immediately followed by progressive internalization at the site of merozoite apical contact, and eventually the closure of the parasitophorous vacuole [33]. However, the cellular interactions between *Babesia* and its host cell have not yet been fully described, notably the disappearance of the parasitophorous vacuole, a *Babesia*-specific feature.

Characterization of the molecules involved in the invasion process, as well as their corresponding erythrocyte receptors, is basic information necessary for the comprehension of RBC invasion. The proteins located on the merozoite surface, for example Bd37 of *B. divergens*, are usually involved in RBC adhesion [8] and are shed during the parasite internalization process [7]. The molecules harboured in the characteristic apicomplexan secretory organelles, rhoptries, micronemes and dense granules (spherical bodies for the genus *Babesia*), are secreted during the invasion process by *Plasmodium*, *Toxoplasma*, and *Eimeria* [2, 3, 39] and are generally involved in parasite internalization [43]. Two of these molecules have been identified

in *B. divergens*, AMA-1 (Apical Membrane Antigen-1) and RAP-1 (Rhoptry Associated Protein-1). AMA-1 is secreted from the micronemes and has been characterized in hemoprotozoans in all *Plasmodium* species analyzed [40] as well as in *B. bovis* [11]. It is apparently involved in host-cell recognition, binding, and possibly motility, however its interaction with host erythrocyte remains controversial [27]. RAP-1, evidenced in several *Babesia* species [6, 16, 36, 38] is supposed to be involved in erythrocyte binding and parasitophorous vacuole formation [42]. These parasitic invasion-related antigens are decapped or secreted into the surroundings during the invasion process [10]. It should therefore be possible to characterize them from the invasion medium.

In summary, the aim of our work was to set up an in vitro *B. divergens* invasion assay to characterize this process, to obtain a synchronized culture in order to focus on stage-specific activities of the parasites, and to collect the proteins in the invasion medium for further characterization in order to elucidate the invasion mechanism.

2. Materials and methods

2.1. In vitro culture of *B. divergens*

B. divergens Rouen 87 was isolated from human in 1987, then kept at Oniris (France), and was cultivated in vitro as described previously [21]. Briefly, parasites were cultured in bovine erythrocytes at 5% haematocrit in RPMI 1640 (Lonza, Belgium) supplemented with 20% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Lonza, Belgium). Cultures were incubated in a humidified 6% CO₂ atmosphere at 37 °C, and amplified in culture flasks to obtain the volume (up to 500 ml) and parasitemia (up to 25%) required for each experiment.

2.2. Methods to prepare free parasites

Three different methods were used to prepare live *B. divergens* parasites. First of all, free merozoites were collected from the culture medium by Percoll gradient separation. Briefly, cultures were centrifuged (2 000 g, 5 min) and the pellet was diluted to 1:3 with RPMI 1640. This suspension was then layered on top of a 1.08 g/ml iso-osmotic Percoll solution prepared according to the manufacturer's instructions (Amersham Bioscience) and centrifuged (2 000 g, 10 min, 20 °C). The merozoites collected at the interface were washed twice in PBS (4 000 g, 10 min, 4 °C). Besides the collection of free merozoites, the intra-erythrocytic parasites could also be liberated by RBC lysis using mechanical (high-voltage electroporation) or chemical methods (osmotic lysis). The electroporation protocol described for *B. bovis* was tested [10]. Parasitized cultures were centrifuged and the pellet (2 ml) was resuspended in an equal volume of cytomix (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 8.0, 25 mM HEPES pH 8.0). Samples of 750 µl were subjected to 5 intermittent (10 s, 0°C) high-voltage pulses (2.5 kV, 200 Ω, 25 µF) in a BioRad Gene Pulser with a pulse controller using 4-mm BioRad cuvettes. The liberated parasites were separated from the non-lysed RBC by Percoll gradient and washed as described before. Osmotic lysis of the RBC was obtained by mixing a 2 ml pellet of infected RBC with 23 ml cytoyi (cytomix modification: 12.6 mM K₂HPO₄, 8.74 mM KH₂PO₄, pH 6.5) at room temperature for 5 min, and then washing with PBS. The pelleted parasites obtained with the three methods tested, were examined on Giemsa-stained smears, and mixed with the invasion medium to test their viability by in vitro invasion assays.

2.3. In vitro invasion media

Since the aim of our study was not only to follow the invasion process but also to analyse the proteins involved, the in vitro invasion media needed to ensure both efficient invasion and the absence of contaminating proteins which could interfere with further proteomic analysis. A synthetic medium was sought which allowed comparable invasion efficiency to that obtained with the culture medium (RPMI 1640 with 20% FCS). Three synthetic media candidates (RPMI 1640, PBS, Tris-Sucrose) were therefore tested with or without the addition of 1 mM calcium or 1 mM magnesium. The culture medium was used as control.

2.4. In vitro invasion assay and evaluation of invasion efficiency

The invasion medium as well as the culture medium used as control were prepared with 5% RBC in 24-well plates (2 ml/well) and pre-warmed at 37 °C. The pelleted parasites collected as previously described were added to each well. The efficiency of the invasion process was determined by counting the infected RBC on Giemsa-stained smears. However, as differentiation of non-invasive or dead parasites located on the surface of RBC from intra-erythrocytic parasites could be difficult, the previously described Percoll separation was used to eliminate the former. The effect of the Percoll separation was checked by performing an invasion assay using free merozoites collected from culture and incubated up to 120 min in RPMI 1640 with RBC. The viability of the intra-erythrocytic parasites was then controlled by washing cells collected after Percoll separation with RPMI 1640, cultivating them for 5 h, then checking for parasitemia. Parasitemia was calculated at each step (before, after Percoll separation, and after culture), on at least 2000 RBC.

2.5. Kinetics of invasion

The kinetics of invasion was followed in the selected synthetic medium, using parasites prepared by electroporation or osmotic lysis. Our aims were twofold: firstly, to acquire information on the timing and nutritional requirements of the *B. divergens* invasion process, and secondly to determine the best moment to collect the invasion medium for further analysis. For this purpose, RBC and parasites were mixed and harvested 0 min, 1.5 min, 3 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 160 min, and 240 min after initial contact. They were

either observed directly on Giemsa-stained smears for morphological analysis, or centrifuged with Percoll gradient and reincubated in culture medium for parasitemia counting. Due to the speed of invasion, a rapid gradient Percoll separation was used: A layer of 500 μ l medium was placed on top of 500 μ l of Percoll in an Eppendorff tube, then centrifuged (30 s, 16 000 g) and washed with RPMI1640. Each pellet was resuspended in 200 μ l of culture medium and transferred to a 96-well microplate for further incubation.

2.5. Origin of sera used

Seven immune sera were used to recognize the proteins collected in the supernatant during invasion. One serum was prepared from a rabbit immunized with Percoll-purified merozoites originating from a panel of *B. divergens* strains, in order to highlight as many parasitic proteins as possible. To pinpoint the proteins involved in the invasion process (i.e. those potentially secreted and thus in contact with the immune system during natural infection), we chose to use sera from two calves experimentally infected with *B. divergens* strains C139 and IV35 respectively [23] and from four sheep experimentally infected with *B. divergens* strain Rouen 87 [29]. To avoid the production of antibodies against RBC proteins, the calves and sheep were infected with parasites cultivated in vitro in their own erythrocytes.

2.6. Analysis of proteins contained in the invasion test supernatant (SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting)

The conditions of efficient invasion were determined from the above assays. In summary, the merozoites were prepared by high-voltage electroporation, then incubated with 5% RBC in RPMI 1640 + 1 mM CaCl₂ for 10 min. After incubation, the culture was centrifuged (16 000 g, 10 min, 4 °C) to eliminate the RBC and remaining free parasites. After addition of Protease Inhibitor Mix 1:100 (Amersham Bioscience), the supernatant was concentrated 12 times by Centrifugal Filter Devices (Millipore-Amicon ultra-15) (10 000 g, 2 h, 4 °C) with a 10 kDa cut-off. Potential contamination with erythrocyte proteins derived from the preparation of parasites for invasion was determined by electroporating non-infected bovine erythrocytes under the same conditions. The resulting pellet was added to the invasion medium, then the supernatant was collected and concentrated in the same way as described above.

The concentrated supernatants were separated on a 12% SDS-PAGE gel, stained with

Coomassie Brilliant Blue R-250 or transferred to a nitrocellulose membrane, which was blocked with 10% skimmed milk in TBS/0.1% Tween 20 (TBSt) overnight. After each incubation, all washes were done three times for 5 min in TBSt. The blots were incubated for 1 h in sera from immunized rabbit, or experimentally-infected calf or sheep, diluted 1/100 in TBSt with 5% skimmed milk. After washing, the membranes were incubated with anti-IgG (anti-rabbit IgG; anti-bovine IgG or anti-sheep IgG coupled to alkaline phosphatase, Sigma Aldrich) diluted 1/1000 in TBSt with 5% skimmed milk for 30 min. The colorimetric reaction was carried out for 5 min with BCIP/NBT liquid substrate system (Sigma Aldrich).

2.7. Inhibition of invasion with anti-sera

One calf serum (C139) and one sheep serum (S-M-SC) were then selected on the basis of the WB analysis and used to validate our protocol in an invasion inhibition assay and to determine the potential function of the proteins detected during invasion. Different dilutions (1/2, 1/4, 1/8) of the antisera were added separately to the invasion medium, before the addition of live merozoites prepared by electroporation. Their effects on invasion were compared to those of the same dilutions of sera from non-infected calf or sheep. After incubation for 10 min, the RBC were washed in RPMI 1640, then re-incubated in culture medium for 5 h before parasitemia control.

2.8. Statistical analysis

A parametric analysis of variance (Anova) was used for the statistical analysis. The test was considered “statistically significant” when the p-value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Percoll separation allows elimination of the extra-erythrocytic parasites and the calculation of invasion efficiency

Parasitemia was measured before and after Percoll separation, and after 5 h incubation in culture medium to determine the efficiency of Percoll separation in eliminating parasites that did not invade erythrocytes during the invasion test and to control the non-toxicity of Percoll on intra-erythrocytic parasites. These measurements were performed 5, 10 and 120 min after the initial contact between RBC and merozoites. Regardless of the time of contact, a significant decrease in parasitemia from 14 fold (5 min) to 4 fold (120 min), was obtained after Percoll separation (Figure 1). This indicates that a large number of parasites were actually free or adhering to the surface of RBC but not internalized, and were therefore efficiently removed by the Percoll separation. The observed decrease in parasitemia according to the time of contact before Percoll separation was not correlated with a corresponding increase of invading parasites (after Percoll). This could be due to the death of extra-erythrocytic parasites. No significant differences in parasitemia were observed before or after additional incubation in culture medium at any of the three contact times (Figure 1). That is to say that Percoll is compatible with the subsequent *in vitro* growth of *B. divergens*. Thus, the following assays included a Percoll separation and reincubation in culture medium to guarantee the reliability of the estimated invasion efficiency. Indeed, the parasitemia count obtained after incubation in culture medium is more reliable due to the size of the parasite.

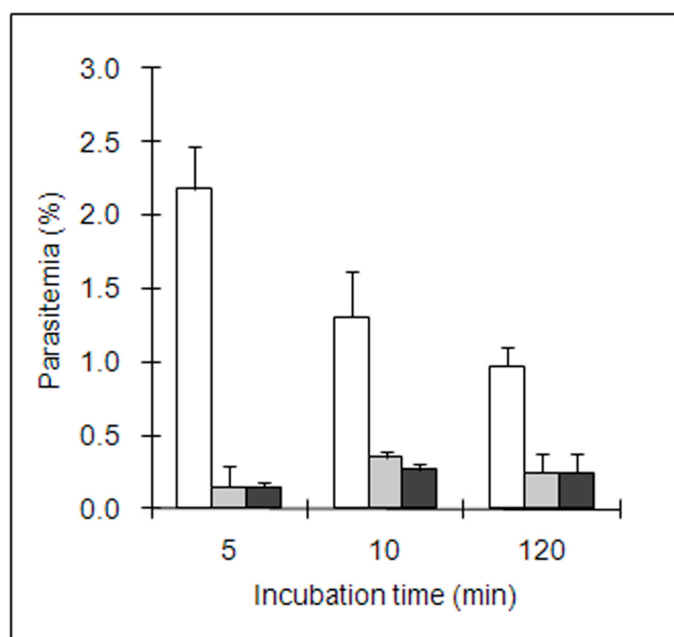


Figure 1. Improvement of invasion efficiency evaluation. Merozoites collected from culture supernatant were used to perform the invasion assay in RPMI 1640. To estimate the amount of intra-erythrocytic parasites (but not the ones attached to the RBC surface), parasitemia was counted before (white bars), after Percoll separation (grey bars) and after 5 h incubation in culture medium (black bars) to control the non-toxicity of the Percoll. Each figure represents the average value of the triplicate assays and error bars indicate the standard deviation.

3.2. Erythrocyte invasion is more efficient in RPMI1640 supplemented with Ca^{2+}

In order to choose a suitable synthetic medium for performing the invasion test, we compared the invasion efficiency in culture medium (RPMI 1640 + 20% FCS) with the invasion efficiencies obtained using three synthetic media (PBS, Tris-Sucrose and RPMI 1640). Calcium and magnesium were added to each synthetic medium to find out if they could improve invasion efficiency. Free parasites were obtained by RBC osmotic lysis, and a 30 min incubation time was used. Among the three synthetic media tested, the same invasion efficiency as the culture medium was only obtained with RPMI 1640 (Figure 2). Parasitemia was significantly lower than the control when PBS or Tris-Sucrose were used. Adding calcium or magnesium had no significant effect except for RPMI 1640 supplemented with calcium. Therefore RPMI 1640 + 1 mM CaCl_2 was selected for the in vitro invasion assays.

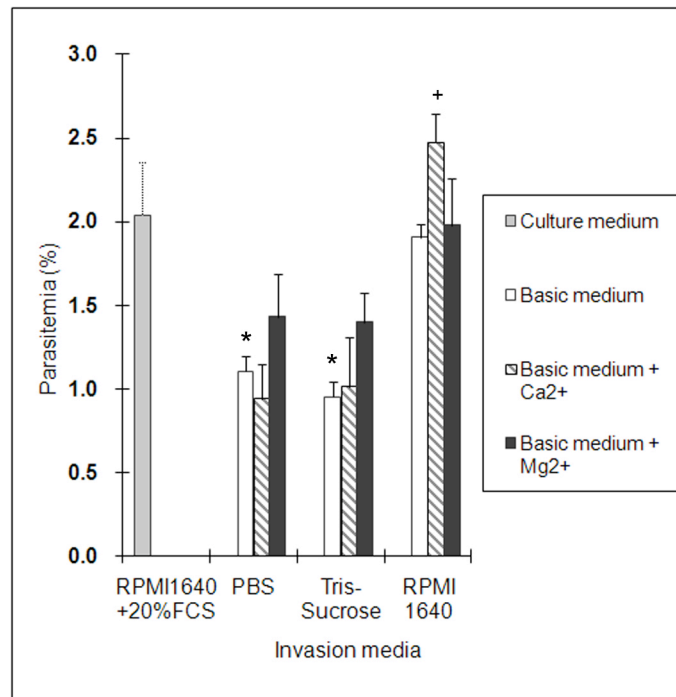


Figure 2. Influence of medium composition on erythrocyte invasion efficiency. Parasites prepared by RBC osmotic lysis were used for this assay. The invasion assays were performed in 3 basic media (white bars): PBS, Tris-sucrose, and RPMI 1640 and compared to the complete medium RPMI 1640 + FCS 20% (gray bar). CaCl₂ (striped bars) or MgCl₂ (black bars) were added at a concentration of 1 mM into the basic media separately to measure their effects on invasion. Each figure represents the average value of parasitemia from the triplicate assays and error bars indicate the standard deviation. Significant differences ($P < 0.05$) between complete medium and basic media are indicated with stars, while significant differences due to addition of calcium or magnesium in each basic medium are indicated with crosses.

3.3. Free, viable, and invasion-competent parasites were obtained by high-voltage electroporation

It is extremely difficult to estimate the number of free and alive parasites due to their size and aggregation. Moreover, parasites might remain in the erythrocyte ghosts after lysis and be unable to invade a new RBC. The best way to compare the quality and quantity of “invasion-competent” parasites is to perform an *in vitro* invasion assay. Starting with the same culture material, RBC osmotic lysis and RBC electroporation produced 5 times and 29 times more “invasion-competent” parasites respectively than merozoites from the culture supernatant (Figure 3). Similar results were obtained in a second assay (data not shown). In comparison to retrieving free merozoites from the supernatant or releasing intra-erythrocytic parasites by osmotic lysis, high-voltage electroporation is clearly the most efficient way of obtaining free

and viable parasites in sufficient amounts for further analysis.

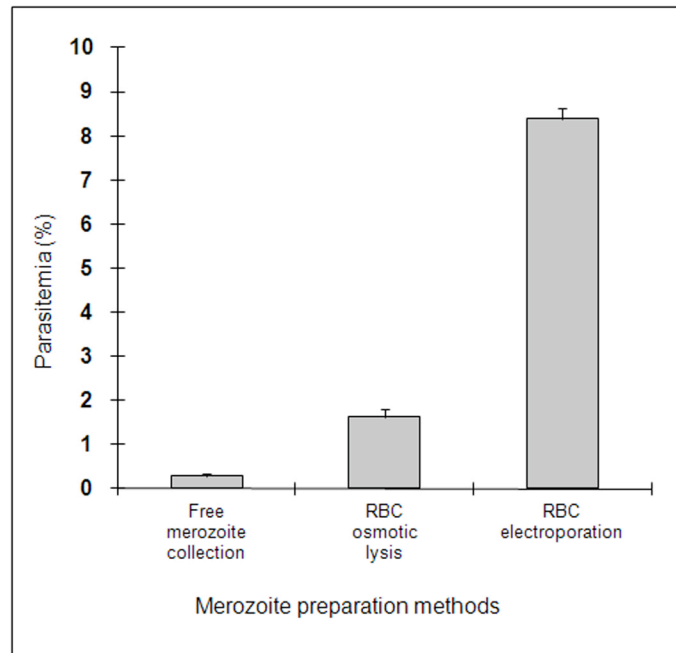


Figure 3. Influence of the methods of merozoite preparation on erythrocyte invasion efficiency. Parasites from the culture medium were collected either by differential centrifugation (free merozoite collection), or liberated from the RBC by osmotic lysis or electroporation. The invasion assays were performed in RPMI 1640 + 1 mM CaCl₂. The experiment was performed twice with similar results, and one of them is presented here. Each figure represents the average value of the triplicate assays and error bars indicate the standard deviation.

3.4. *B. divergens* invasion of the erythrocyte is a rapid process

B. divergens parasites prepared by RBC lysis (osmotic and electroporation) were used to follow the kinetics of invasion by analysing parasitemia after contact with RBC ranging from 0 to 240 min. Although a huge difference in the maximum parasitemia attained in these two assays was observed (which confirmed the choice of electroporation as the better method of parasite preparation), the trends of the two curves were comparable (Figure 4A). *B. divergens* invasion of RBC occurred within seconds. A contact of 45 s (the time required to mix RBC with parasites, and to perform Percoll separation) was indeed sufficient to attain 50% (RBC osmotic lysis) and 70% (RBC electroporation) of maximum parasitemia.

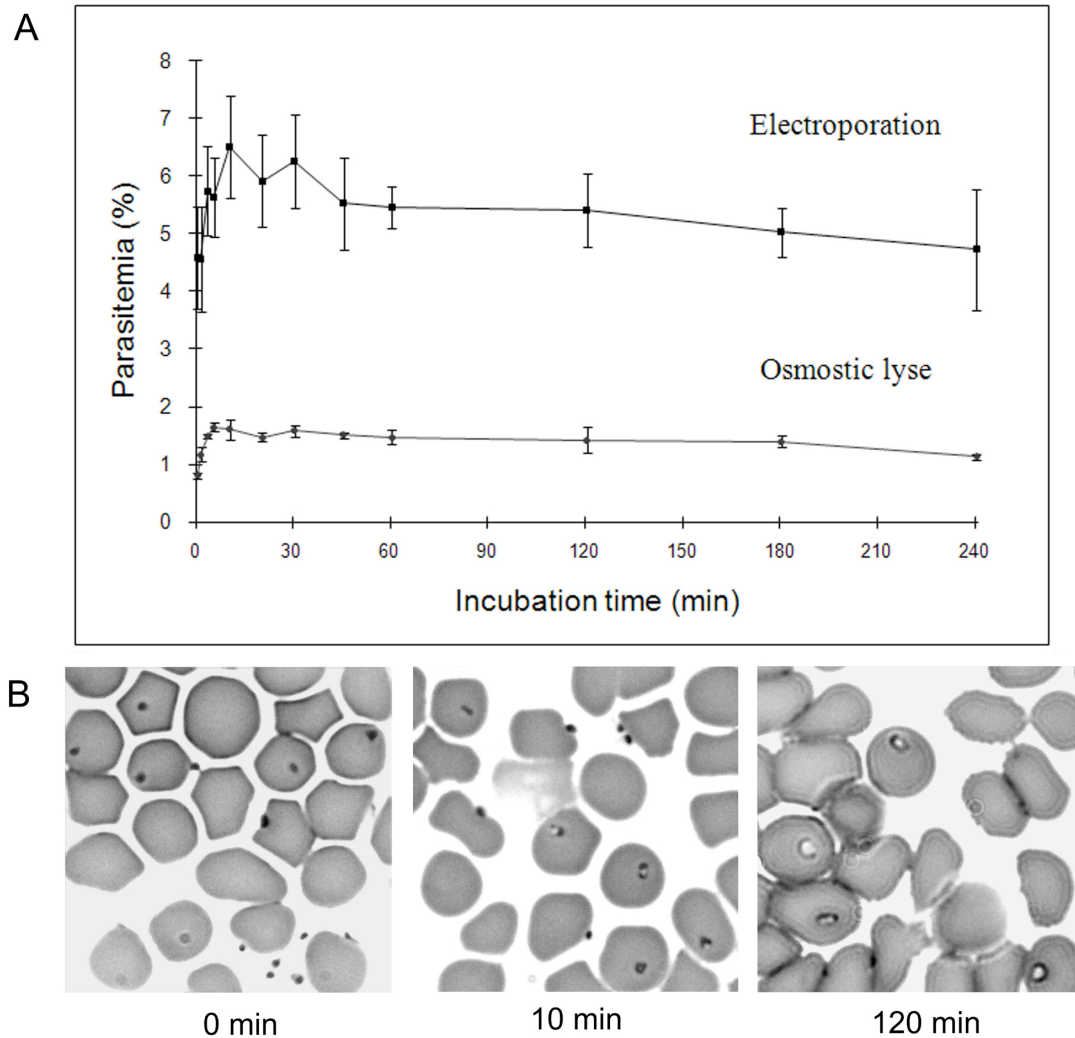


Figure 4. A). Kinetics of erythrocyte invasion. Curves indicate the percentage of erythrocytes invaded with parasites prepared by high-voltage electroporation (squares) or by osmotic lysis (rounds) according to the time of incubation. Each figure represents the average value of parasitemia from the triplicate assays and error bars indicate the standard deviation. **B). Photomicrographs of bovine erythrocytes invasion after the initial contact between RBC and merozoites.**

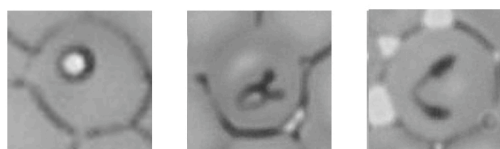
Ten minutes after the initial contact, all “invasion-competent” parasites had penetrated the RBC, since no further increase in parasitemia was observed over time. Microphotographs of Giemsa-stained smears prepared 0, 10 and 120 min after contact and before Percoll separation were taken to show the evolution of parasite morphology (Figure 4B). Free parasites, some adhering to the RBC surface, were visible after contact (0, 10 min). Their quantities seemed to diminish with time (120 min). Intra-cellular parasites were visible immediately after the contact with RBC. Their shape changed rapidly, from condensed intra-erythrocytic black particles at the

very beginning, to trophozoites with the appearance of cytoplasm (white areas) inside the parasite at ten minutes, which expanded to become clearly visible 120 min later. Parasites with homogeneous size and shape were still visible 120 min after the beginning of the culture.

3.5. The intra-erythrocytic development of *B. divergens* is asynchronous

The development of *B. divergens* after invasion was followed by calculating the percentages of different parasite stages (trophozoite, beginning and end of cellular division) at different incubation times (Table I). To improve synchronization, late invasions were avoided by eliminating extra-erythrocytic parasites 10 min after the contact between RBC and parasites. Up to 3 h after RBC invasion, the only parasite forms observed in the culture were trophozoites (Table I).

Table I. Evolution of the *B. divergens* intraerythrocytic population following an invasion assay. Percentage of parasites at the stages of trophozoite, onset of cellular division and end of cellular division were counted from 3 to 9 h after the contact between free parasites and red blood cells.



	Trophozoite (%)	Onset of division (%)	End of division (%)
3h	100	0	0
4h	98.7	1.3	0
5h	96.6	1.5	1.9
6h	88.8	6.0	5.2
8h	75.7	2.6	21.7
9h	65.6	1.9	32.5

The onset of division was observed at 4 h. The proportion of the population at this stage increased for at least 2 h, peaked between 6-7 h after invasion and then decreased. Fully divided parasites were observed 1 h after the onset of division, and accounted for one third of the observed parasite population 9 h after invasion. The trophozoite population exhibited a considerable decline after invasion, from 6 h on, but remained the main population detected.

Eight hours after invasion, at least 30% of the parasites had fully divided to produce about 8×10^7 merozoites/ml, each invading a new RBC and resulting in a new trophozoite. This occurrence of a second generation explained the maintenance of a trophozoite population in the culture. Even when the time window for invasion to occur was limited to 10 min, the onset of division extended for 6 h (from 4 to 9 h after invasion), thus indicating the extremely heterogeneous intra-cellular development of this parasite.

3.6. RBC can be invaded by two *B. divergens* merozoites

Occasionally, after an invasion assay, two trophozoites were observed within the same RBC (Figure 5) and accounted for about 3% of the infected RBC. Their occurrence was observed just after invasion. They were similar in shape and size not only within a double infected erythrocyte, but also compared to single trophozoites, and this was observed 1 h and 4 h after invasion (Figure 5). Their presence in such an assay indicated the ability of two merozoites to invade a single target cell.

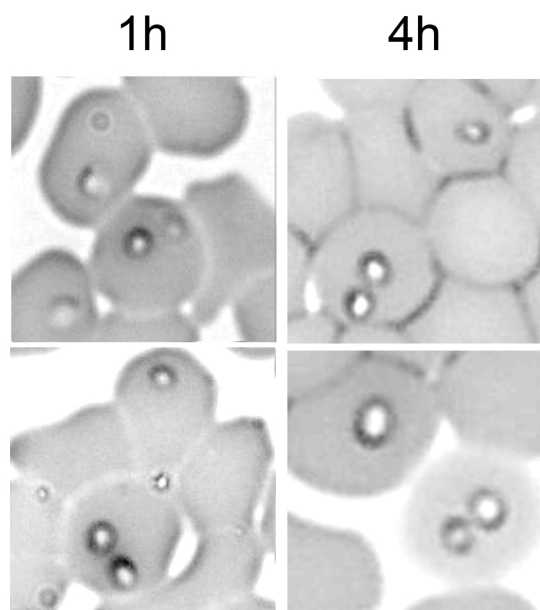


Figure 5. Photomicrographs demonstrating the presence of two trophozoites in one RBC 1 h and 4 h after the start of invasion.

3.7. *B. divergens* antigens were released into the environment during the invasion assay

The proteins collected in the supernatant were analysed by SDS-PAGE. As a result of RBC lysis, many contaminating RBC proteins were present in the control lane (lane S) as well as in the test lane (lane P) (Figure 6A). The main parasite-derived proteins collected during the invasion assay (molecular weights ranging from 36 kDa to 104 kDa) are highlighted with arrows on lane P.

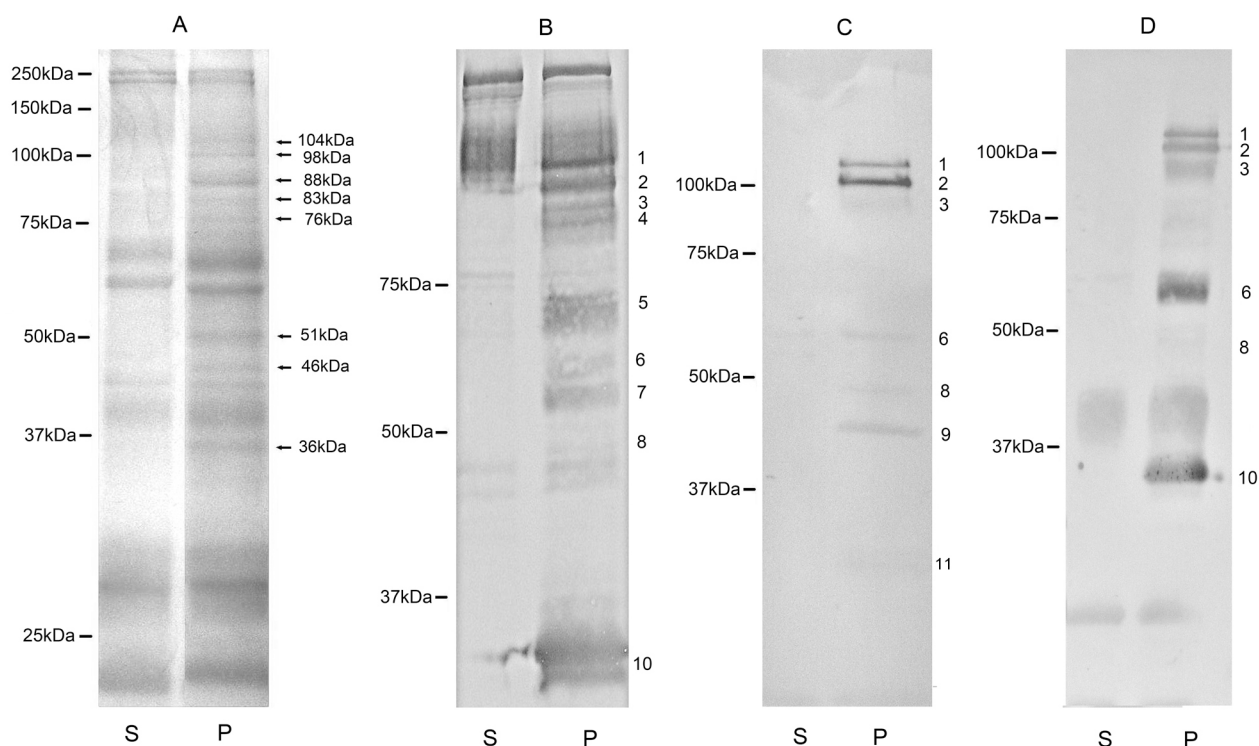


Figure 6. A). SDS-PAGE of proteins released into the supernatant during erythrocyte invasion. B, C, D). Proteins recognized by serum of rabbit, of representative calf C139 and sheep S-M-SC respectively by Western blotting. Lane S, supernatant of invasion with lysed extract of healthy RBC. Lane P, supernatant of invasion with liberated parasites. The bars on the left of each photograph indicate the molecular masses of standard markers. Arrows indicate *B. divergens*-derived proteins. Band Nos. 1 to 11 are the suspicious antigens which might be involved in the invasion process.

The collected proteins were also analysed by Western blotting with different *B. divergens* antisera. Many contaminating RBC proteins were recognized by rabbit antiserum, thereby confirming the presence of RBC contamination in the parasite preparation used for

immunization (Figure 6B). As expected, few (Figure 6D) or none (Figure 6C) of these proteins were detected in sera obtained from experimentally-infected animals. Three proteins with molecular weights of about 110 kDa, 102 kDa, and 95 kDa (respectively No. 1, 2, 3 on Figure 4) were recognized by all tested sera (7 sera in total, 3 of them shown as representative), even by calf sera collected at an early stage of infection (14 days) (Figure 6C). The other antigens were detected in different combinations depending on the serum.

3.8. Antisera from experimentally-infected animals inhibit *B. divergens* invasion

The invasion assay was used to test the inhibitory effect of two selected sera on invasion. For both sera, an inhibition of invasion was observed at each dilution tested (up to 1/8) and the effect was dose-dependent (figure 7). Invasion was reduced by up to 80% in the case of calf antiserum. Sheep negative serum also had an inhibitory effect on invasion, an effect that had already been noted on growth of *B. divergens* [22]. It could therefore be postulated that the proteins detected by Western blotting with these sera had a role in the invasion process.

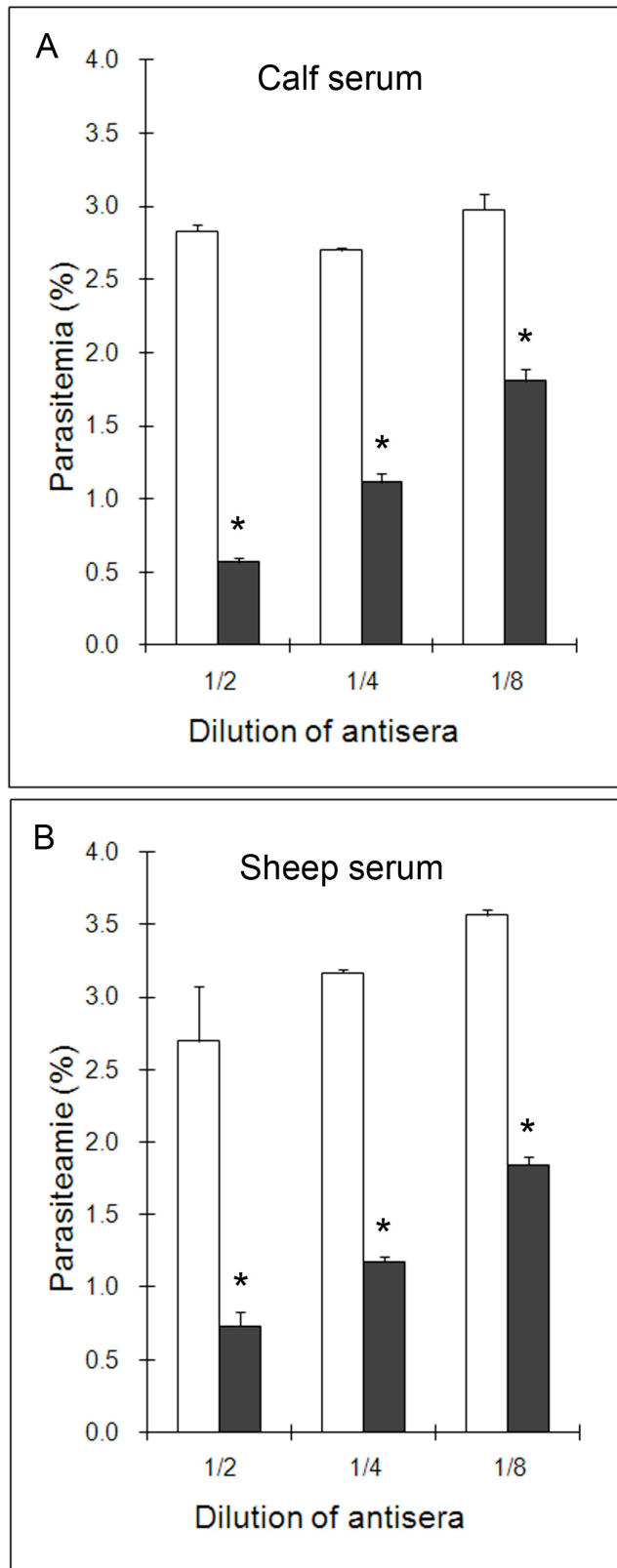


Figure 7. Inhibition of invasion by sera directed against *B. divergens*. Invasion was performed with antisera of calf C139 and sheep S-M-SC (black bars) and compared to the negative sera of calf and sheep (white bars). Each figure represents the average value of the triplicate assays and error bars indicate the stand deviation. Significant differences ($P < 0.05$) between antisera and negative sera are indicated with stars.

4. Discussion

Studies of the invasion process in *Babesia* are of pivotal importance since only this Apicomplexan genus has infectious forms (merozoites and sporozoites) which start their host invasion directly by erythrocyte penetration. However, very little information is available on this process compared, for example, to that of *Plasmodium*. We focussed our studies on *B. divergens* because it is the major hemoparasite of cattle in Europe with zoonotic transmission. We developed an in vitro invasion assay to acquire knowledge of the process and molecules involved in invasion of the RBC by *B. divergens*.

The choice of medium used to obtain efficient invasion in vitro is crucial. Of the three media tested, RPMI 1640+ 20% FCS and RPMI 1640 exhibited the same invasion efficiency. Although serum is known to be essential for *Babesia* growth in vitro, we demonstrate here, as reported for *B. bovis* and *P. falciparum* [1, 10], that it is not necessary for erythrocyte invasion by *B. divergens*. The invasion efficiency measured with PBS (used for the *B. bovis* invasion test in Franssen et al., 2003) and Tris-Sucrose was significantly lower. The relative invasion efficiencies with PBS compared to the control medium were comparable for *B. bovis* (about 60%) and *B. divergens* (54%). However, the positive effect of calcium addition to PBS was significant only in the case of *B. bovis* invasion. A positive and significant effect of calcium addition was observed in our study only when RPMI 1640 was used (parasitemia increased by 30%). The role of extra-cellular calcium in merozoite invasion of the erythrocyte is well documented for *P. falciparum* [24] and *B. bovis* [10]. In our case, its effect depended on the medium.

Compared to the two other methods of merozoite preparation (collection of free merozoites in the culture supernatant and liberation of intra-cellular merozoites by osmotic lysis), electroporation of infected RBC was able to provide a greater number of “invasion-competent” parasites. Electroporation is a simple and effective method for the disruption of cell membranes by application of an external electric field. We confirmed the suitability of this method for *B. divergens*, as already described for *B. bovis* [10]. The amount of “invasion-competent” merozoites produced is large enough to establish a culture with parasitemia ranging from 5 to 14%. Such high parasitemia could not be achieved by osmotic lysis which repeatedly produced

subsequent cultures with parasitemia ranging between 1 to 2%. The harmful effect of the medium used for RBC lysis was probably responsible for the death of the released parasites. A maximum parasitemia of 0.5% was obtained when free merozoites collected from the culture supernatant were used. This probably reflects the limited number of free merozoites in the supernatant or their low viability. According to our data, we collected about 5×10^6 “invasion-competent” merozoites from 40 ml of culture, calculated from the parasitemia after invasion (Figure 1). Other authors were able to collect about 10^8 merozoites from the same volume of culture [28]. There are two possible explanations for this difference. Firstly, the maximum parasitemia values of the initial cultures were different (20% vs 70%, due to the erythrocyte type, bovine vs human), which would influence the amount of free merozoites. Secondly, only about 10% of the collected merozoites were demonstrated to be “invasion-competent” (Figure 1), a characteristic that was not investigated for *B. bovis*. As demonstrated in this study, *B. divergens* invasion is an extremely rapid process meaning that “invasion-competent” merozoites remain freely in the medium for a very short time. The merozoites collected from the supernatant were probably those that had remained for a long time in the medium and were thus probably “non-invasion-competent” (dead or non-viable).

By electroporation, 6.4×10^9 infected RBC were necessary to obtain a culture with 6% parasitemia. This corresponds to 4.8×10^7 infected RBC after invasion, that is to say that only 0.75% of the prepared parasites were “invasion-competent”, i.e. viable merozoites. This low percentage might be explained by the asynchronous status of the culture. The invasion yield could be optimized by using a synchronized culture to increase the proportion of geminate-stage parasites.

The in vitro invasion assay presented in this study permits analysis of the kinetics of invasion, especially its rapidity. The invasion of *B. divergens* proceeded rapidly after the initial contact between parasites and RBC, since 70% of the “invasion-competent” parasites invaded a RBC within 45 s, and the maximum level of invasion was attained within 10 min. Rapid invasion has also been observed for other Apicomplexan parasites. Attachment of *B. bovis* to RBC was achieved within 5 min, whereas 41% of the maximum level of invasion was attained after 15 min, and the maximum after 1 h [10]. Erythrocyte invasion by *P. knowlesi* was shown to be accomplished within minutes after the initial contact [26]. For *P. falciparum*, 80% of the

invasion events occur within 10min of mixing merozoites and RBC [1]. A recent study on *P. falciparum* demonstrated that merozoites recognized new target RBC within 1 min after their release from the host RBC. Parasite entry ensued and was complete on average 27.6 s after primary contact [12]. During the asexual multiplication of intra-erythrocytic Apicomplexans, the merozoite is the only stage in contact with the host immune system. *B. divergens* and other Apicomplexan parasites have developed an efficient invasion mechanism to minimize the time of contact and ensure survival in their vertebrate hosts.

Another application of this in vitro invasion assay is the collection of proteins released by the parasites during the invasion process. Host-cell invasion by apicomplexan parasites involves the successive exocytosis of secretory organelles into the RBC and into the environment [9]. These proteins, present in in vitro culture, can induce a high degree of protection against virulent heterologous challenge exposure [32, 41]. They are thought to be potential sources of antigens to induce protective immunity. Moreover, their characterization should provide a better understanding of the molecular support underlying host cell invasion.

A minimum invasion level has to be reached to ensure that the amount of proteins is large enough for their characterization, which is why an efficient method of merozoites preparation is crucial to the invasion assay. With our assay we were able to collect, in 1 ml of invasion medium, the proteins secreted by 4.8×10^7 to 1.1×10^8 invasion competent parasites within 10 min, depending on the assay (with parasitemia of subsequent cultures ranging from 6 to 14%).

Proteins collected from the invasion assay supernatant were labelled by Western blotting with different antisera. As expected, the antibodies of rabbit antisera prepared by immunization with Percoll-separated merozoites recognized numerous proteins including probably house-keeping ones. On the contrary, sera from experimentally-infected animals (calves or sheep) recognized fewer proteins (about 6). These sera are most probably enriched in antibodies that specifically recognize merozoite surface antigens or proteins secreted during invasion by the apical organelles of the merozoite (rhoptries and micronemes). Among these proteins, some were recognized by calf sera collected early during the infection process (proteins No.1, 2, 3, Figure 6C) and could thus be considered as immunodominant. Others (proteins No. 8 and 9, Figure 6C) could correspond to already described invasion-related proteins, such as AMA-1 [28] and RAP-1 [36]. An invasion inhibition assay was performed to determine the participation of

these recognized proteins in the invasion process. The significant and dose-dependent inhibitory effect of sera from infected animals on erythrocyte invasion suggests such a role. Further investigations are needed for their identification as potential vaccine candidates.

The asexual multiplication of *B. divergens*, in vivo as well as in vitro, is asynchronous and methods of obtaining a synchronized *Babesia* culture are lacking. Research using synchronized culture is essential to study DNA transcription and protein expression at different parasitic stages. Synchronized cultures could also be used to identify the precise cellular steps (DNA replication, cell division) targeted by drugs. *B. bovis* in vitro invasion with isolated parasites was not able to provide a synchronized culture [10]. For the purpose of obtaining a synchronized culture of *B. divergens*, non-lysed RBC (infected or not) were eliminated after electroporation. Moreover, the invasion window time was restricted to 10 min, and could be further reduced by removing extra-erythrocytic parasites from the RBC earlier to obtain an improved synchronized start. Even so, the intra-erythrocytic development of the parasite did not remain synchronized. However, this assay could be used to study gene transcription and expression in relation to the onset of main cell-cycle features, such as DNA replication or cell division events. Synchronization was well developed for *Plasmodium*, *Toxoplasma* [5] and *Theileria* [37], but was barely achieved for *Babesia* [10]. A synchronized culture of *P. falciparum* with a large age range (3-5 h) was obtained by density gradients [15, 17], differential osmotic lysis of parasitized erythrocytes [18], temperature shifts [34], and recently optimized to a specific cell-cycle phase with growth inhibitors [30]. Further improvement of the synchronization of *B. divergens* cultures will probably rely on drugs that specifically block key points in the cell cycle. However, the effects of such molecules on *B. divergens* remain uncharacterized.

To sum up, we established an efficient in vitro invasion assay for *B. divergens*. Thanks to this assay, we demonstrated that RBC invasion occurred in less than 45 s, and that the invasion of one erythrocyte by two merozoites is possible. Synchronization, even partial, of a culture could allow transcription and translation studies during the cell-cycle. By uncoupling invasion and intra-erythrocytic development, studies of the actions of inhibitory compounds that specifically target these stages would be feasible. The presence in the assay medium of proteins involved in invasion was confirmed by an inhibition invasion assay with antibodies from

experimentally-infected animals. The invasion assay provides the possibility of more accurate and specific comparisons of the invasion process between *B. divergens* and other Apicomplexa. More specifically, *Babesia*-specific characteristics such as disappearance of the parasitophorous vacuole or more generally the molecular basis of host specificity could be investigated.

Acknowledgments

This work was supported by research funds from the Institut National de la Recherche Agronomique, and Oniris (France). Y. Sun's PhD thesis is financed by Région Pays de Loire. We wish to acknowledge the group IECM for allowing access to the electroporation apparatus and S. Nusinovici for his help with the statistical analysis.

References

- [1] Boyle M.J., Wilson D.W., Richards J.S., Riglar D.T., Tetteh K.K., Conway D.J., Ralph S.A., Baum J., Beeson J.G., Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2010) 107:14378-14383.
- [2] Camus D., Hadley T.J., A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites, Science. (1985) 230:553-556.
- [3] Carruthers V.B., Sibley L.D., Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts, Eur J Cell Biol. (1997) 73:114-123.
- [4] Chauvin A., Valentin A., Malandrin L., L'Hostis M., Sheep as a new experimental host for *Babesia divergens*, Vet. Res. (2002) 33:429-433.
- [5] Conde de Felipe M.M., Lehmann M.M., Jerome M.E., White M.W., Inhibition of *Toxoplasma gondii* growth by pyrrolidine dithiocarbamate is cell cycle specific and leads to population synchronization, Mol. Biochem. Parasitol. (2008) 157:22-31.
- [6] Dalrymple B.P., Casu R.E., Peters J.M., Dimmock C.M., Gale K.R., Boese R., Wright I.G., Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*, Mol. Biochem. Parasitol. (1993) 57:181-192.
- [7] Delbecq S., Precigout E., Vallet A., Carcy B., Schetters T.P., Gorenflot A., *Babesia divergens*: cloning and biochemical characterization of Bd37, Parasitology. (2002) 125:305-312.
- [8] Delbecq S., Auguin D., Yang Y.S., Lohr F., Arold S., Schetters T., Precigout E., Gorenflot

A., Roumestand C., The solution structure of the adhesion protein Bd37 from *Babesia divergens* reveals structural homology with eukaryotic proteins involved in membrane trafficking, *J. Mol. Biol.* (2008) 375:409-424.

[9] Dubremetz J.F., Garcia-Reguet N., Conseil V., Fourmaux M.N., Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa, *Int. J. Parasitol.* (1998) 28:1007-1013.

[10] Franssen F.F., Gaffar F.R., Yatsuda A.P., de Vries E., Characterisation of erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites efficiently released from their host cell after high-voltage pulsing, *Microbes. Infect.* (2003) 5:365-372.

[11] Gaffar F.R., Yatsuda A.P., Franssen F.F., de Vries E., Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1, *Infect. Immun.* (2004) 72:2947-2955.

[12] Gilson P.R., Crabb B.S., Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites, *Int. J. Parasitol.* (2009) 39:91-96.

[13] Gray J.S., Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe, *Int. J. Med. Microbiol.* (2006) 296 Suppl. 1 40:131-136.

[14] Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford S.R., 3rd, Krause P.J., Persing D.H., Babesiosis, *Clin. Microbiol. Rev.* (2000) 13:451-469.

[15] Jensen J.B., Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1978) 27:1274-1276.

[16] Kappmeyer L.S., Perryman L.E., Hines S.A., Baszler T.V., Katz J.B., Hennager S.G., Knowles D.P., Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Clin. Microbiol.* (1999) 37:2285-2290.

[17] Kutner S., Breuer W.V., Ginsburg H., Aley S.B., Cabantchik Z.I., Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development, *J. Cell. Physiol.* (1985) 125:521-527.

[18] Lambros C., Vanderberg J.P., Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic

stages in culture, *J. Parasitol.* (1979) 65:418-420.

[19] Langton C., Gray J.S., Waters P.F., Holman P.J., Naturally acquired babesiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) herd in Great Britain, *Parasitol. Res.* (2003) 89:194-198.

[20] Lewis D., Williams H., Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*, *Nature.* (1979) 278:170-171.

[21] Malandrin L., L'Hostis M., Chauvin A., Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using in vitro culture, *Vet. Res.* (2004) 35:131-139.

[22] Malandrin L., Marchand A.M., Chauvin A., Development of a microtitre-based spectrophotometric method to monitor *Babesia divergens* growth in vitro, *J. Microbiol. Methods.* (2004) 58:303-312.

[23] Malandrin L., Jouglin M., Sun Y., Brisseau N., Chauvin A., Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*, *Int. J. Parasitol.* (2010) 40:277-284.

[24] McCallum-Deighton N., Holder A.A., The role of calcium in the invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* (1992) 50:317-323.

[25] Mehlhorn H., Schein E., The piroplasms: life cycle and sexual stages, *Adv. Parasitol.* (1984) 23:37-103.

[26] Miller L.H., Aikawa M., Dvorak J.A., Malaria (*Plasmodium knowlesi*) merozoites: immunity and the surface coat, *J. Immunol.* (1975) 114:1237-1242.

[27] Mitchell G.H., Thomas A.W., Margos G., Dluzewski A.R., Bannister L.H., Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells, *Infect. Immun.* (2004) 72:154-158.

[28] Montero E., Rodriguez M., Oksov Y., Lobo C.A., *Babesia divergens* apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell, *Infect. Immun.* (2009) 77:4783-4793.

[29] Moreau E., Jouglin M., Chauvin A., Malandrin L., *Babesia divergens* experimental infection of spleen-intact sheep results in long-lasting parasitemia despite a strong humoral response: preliminary results, *Vet. Parasitol.* (2009) 166:205-211.

[30] Naughton J.A., Bell A., Studies on cell-cycle synchronization in the asexual erythrocytic

stages of *Plasmodium falciparum*, Parasitology. (2007) 134:331-337.

[31] Nilsson O., Nordkvist M., Ryden L., Experimental *Babesia divergens* infection in reindeer (*Rangifer tarandus*), Acta. Vet. Scand. (1965) 6:353-359.

[32] Patarroyo J.H., Prates A.A., Tavares C.A., Mafra C.L., Vargas M.I., Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine babesiosis, Vet. Parasitol. (1995) 59:189-199.

[33] Preiser P., Kaviratne M., Khan S., Bannister L., Jarra W., The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion, Microbes. Infect. (2000) 2:1461-1477.

[34] Rojas M.O., Wasserman M., Effect of low temperature on the in vitro growth of *Plasmodium falciparum*, J. Eukaryot. Microbiol. (1993) 40:149-152.

[35] Shaw M.K., The same but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells, Int. J. Parasitol. (1997) 27:457-474.

[36] Skuce P.J., Mallon T.R., Taylor S.M., Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*, Mol. Biochem. Parasitol. (1996) 77:99-102.

[37] Stagg D.A., Chasey D., Young A.S., Morzaria S.P., Dolan T.T., Synchronization of the division of *Theileria* macroschizonts and their mammalian host cells, Ann. Trop. Med. Parasitol. (1980) 74:263-265.

[38] Suarez C.E., Palmer G.H., Hotzel I., McElwain T.F., Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus, Mol. Biochem. Parasitol. (1998) 93:215-224.

[39] Tomley F.M., Bumstead J.M., Billington K.J., Dunn P.P., Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*, Mol. Biochem. Parasitol. (1996) 79:195-206.

[40] Triglia T., Healer J., Caruana S.R., Hodder A.N., Anders R.F., Crabb B.S., Cowman A.F., Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species, Mol. Microbiol. (2000) 38:706-718.

[41] Valentin A., Precigout E., L'Hostis M., Carcy B., Gorenflot A., Schrevel J., Cellular and humoral immune responses induced in cattle by vaccination with *Babesia divergens* culture-derived exoantigens correlate with protection, Infect. Immun. (1993) 61:734-741.

[42] Yokoyama N., Suthisak B., Hirata H., Matsuo T., Inoue N., Sugimoto C., Igarashi I., Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity, *Infect. Immun.* (2002) 70:5822-5826.

[43] Yokoyama N., Okamura M., Igarashi I., Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage, *Vet. Parasitol.* (2006) 138:22-32.

[44] Zintl A., Mulcahy G., Skerrett H.E., Taylor S.M., Gray J.S., *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance, *Clin. Microbiol. Rev.* (2003) 16:622-636.

Article N° 4 : Characterization, localization, expression and genetic variability of *Babesia divergens* Rhoptry-Associated Protein 1 (RAP-1) (Caractérisation, localisation, expression et variabilité génétique de RAP-1 chez *Babesia divergens*)

Babesia divergens est un parasite intra-érythrocytaire transmis par la tique avec une multiplication asexuée obligatoire chez son hôte vertébré. Afin de caractériser des protéines impliquées dans l'invasion du globule rouge chez *B. divergens*, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux (Mabs) produits au laboratoire et testé leur effet sur la croissance de *B. divergens* in vitro. Quatre Mabs ont été retenus : l'un d'entre eux, 5D6, reconnaît une protéine de 37 kDa. Les 3 autres reconnaissent une protéine de 47 kDa. L'analyse par spectrométrie de masse de ces protéines sur gel a permis d'identifier dans le premier cas Bd37 et dans l'autre cas RAP-1. La séquence complète de RAP-1 chez la souche Rouen 87 F5 a été obtenue à l'aide d'amorces sélectionnées d'après la séquence publiée de RAP-1 putative. Les caractéristiques connues pour les membres de la famille RAP-1 sont retrouvées. Les comparaisons avec les séquences de *rap-1* présentes dans Genbank confirment l'homologie de la séquence obtenue avec celles des autres *rap-1* des *Babesia*. *B. divergens* semble toutefois faire partie d'un groupe phylogénétique distinct de celui des autres *Babesia* du bovin ou de celui des *Babesia* du chien. Le polymorphisme génétique de *Bdrap-1* révèle une très forte conservation parmi les souches bovines françaises.

La localisation de RAP-1 par microscopie électronique confirme sa présence dans les rhoptries, et plus précisément au niveau du bulbe. Par RT-PCR sur une culture débutée de façon synchronisée, des transcrits de *Bdrap-1* sont mis en évidence dès le début du développement intra-érythrocytaire, avec une augmentation de leur quantité deux heures après l'invasion. Une régulation au niveau transcriptionnel est suggérée. Une augmentation de l'expression de RAP-1 est observée à partir de 4 heures après l'invasion du globule rouge, ce qui correspond au début de la division cellulaire.

Characterization, cellular localization, expression and genetic variability of *Babesia divergens* Rhoptry-Associated-Protein 1

Yi Sun^{a,b,c}, Claire Becker^{a,b}, Emmanuelle Moreau^{a,b,c}, Laurence Dubreil^{c,d}, Hélène Rogniaux^e, Olivier Plantard^{a,b,c}, Alain Chauvin^{a,b,c}, Jean-François Dubremetz^f, Laurence Malandrin^{a,b}

- a. ONIRIS, UMR1300, F-44307 Nantes, France.
- b. INRA, UMR1300, F-44307 Nantes, France.
- c. Université Nantes Angers Le Mans, France
- d. INRA, UMR 703, F-44307 Nantes, France
- e. INRA, URI1268 Biopolym eres Interaction Assemblages, Plate-Form BIBS, F-44300 Nantes, France
- f. UMR CNRS 5203, INSERM U661, Université de Montpellier 1 et 2, 34094 Montpellier, France

Corresponding author- INRA, Oniris, UMR1300, Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risques, BP 40706, F-44307 Nantes, France. Phone : +33 (0) 2 40 68 78 57 Fax : +33 (0) 2 40 68 77 51 - E-mail address : yi.sun@oniris-nantes.fr

Abstract

Babesia divergens is an apicomplexan hemoparasite responsible of cattle babesiosis in Europe. We are interested in the understanding of the erythrocyte invasion process and particularly by the characterization of the proteins involved in this process and by their genetic variability. Rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) is a protein secreted from rhoptries for the purpose of fulfilling an essential function in host cell invasion. In this study, a protein recognized by monoclonal antibodies, was analysed by mass spectrometry and blasted as *B. divergens* RAP-1 with 90.1% amino acid identity. The growth of parasite was inhibited by 90% by the addition of this antibody to the culture medium, suggesting the function of BdRAP-1 in the invasion. Distinctive features of RAP-1 family were conserved in the Bdrap-1 sequence. Phylogenetic analysis indicates that it may belong to an independent group which is in the middle of (*B. canis* + *B. gibsoni*) group and (*B. bovis*+ *B. ovis* + *B. caballi*) group with the low bootstrap value. The localization of BdRAP-1 in the bulb of rhoptry was confirmed by immunoelectron microscopy. The transcription of Bdrap-1 is a combination of constant regulation and upregulation with the onset of parasite division. The expression of BdRAP-1 increases considerably in the course of the parasite the development. The high conservation level of *B. divergens rap-1* gene on French clonal lines may reflect its functional constraints.

Keywords : *B. divergens*, rhoptry, RAP-1, invasion, erythrocyte, Bd37

Introduction

Babesia divergens is a causative agent of bovine babesiosis known to be prevalent in the cattle industry in Europe (Zintl et al., 2003). Understanding the basic molecular mechanism of the asexual multiplication of *B. divergens*, especially the process of merozoite invasion into the RBC, may provide important knowledge about the biology of this intracellular parasite.

The invasion of erythrocytes by merozoites is a multistep process that includes attachment, reorientation of the apical end of merozoite, tight junction formation, sequential secretion of the proteins of organelles located at the apical tip of merozoite, parasitophorous vacuole formation and internalisation into the host cell (Carruthers et al., 1999). To carry out this process, specialized organelles of Apicomplexa parasites, rhoptries, micronemes, and spherical bodies are believed to play an important role by sequentially secreting proteins involved in these successive steps (Preiser et al., 2000; Yokoyama et al., 2002; Yokoyama et al., 2006; Kaneko, 2007).

Rhoptries are an important part of the elaborate and complex invasion device common to all Apicomplexa, and are unique secretory organelles with no equivalent known in other phyla. Exocytosis of rhoptries is suggested during invasion, as proteins from the rhoptries are found in the vacuole membrane early during the process (Dubremetz et al., 1993). Due to their involvement in erythrocyte invasion, and thus pathogenesis, rhoptry proteins are prime candidates for the development of improved vaccines against bovine babesiosis (Brown et al., 1998; Brown and Palmer, 1999).

RAP-1 (Rhoptry-Associated-Protein 1) is one of these proteins. It has been initially described in *B. bovis* and *B. bigemina* but occurs in all babesial species examined with significant homologies (Dalrymple et al., 1993; Skuce et al., 1996; Suarez et al., 1998; Kappmeyer et al., 1999). The defining molecular features of the *Babesia* RAP-1 family include the presence of a signal peptide and strict conservation of four cysteins, a conserved 14 amino acid motif, and several shorter conserved motifs in the first 300 amino acids of the molecules (Suarez et al., 1991). RAP-1 has been characterized as a multigene family, with simple arrangement (two head to tail conserved genes for *B. bovis*) to extremely complex locus arrangement (4 polymorphic *rap-1a* genes and two other classes of divergent genes *rap-1b* and *rap-1c* for *B. bigemina*) (Suarez et al., 1998; Suarez et al., 2003). The role of RAP-1 in the erythrocyte invasion process has been postulated initially through attachment,

invasion or growth inhibition experiments using RAP-1 directed antibodies (Mosqueda et al., 2002; Yokoyama et al., 2002). The dose-dependent specific binding of RAP-1 to the bovine RBC has also been documented (Yokoyama et al., 2002). All these evidence suggest that RAP-1 has an important role in parasite invasion and thus pathogenesis. Moreover, cattle immunized with purified native *B. bigemina* RAP-1 and recombinant *B. bovis* RAP-1 resulted in promising protection upon challenge infection (McElwain et al., 1991; Wright et al., 1992; Machado et al., 1997; Fish et al., 2008), pointing this antigen as a potential vaccine candidate.

In this study, we report the functional characterization of *B. divergens* RAP-1 using monoclonal antibodies (Mabs), including its localization, its expression in the course of the intra-erythrocytic parasite development, and its role in parasite invasion. Genetic polymorphism of *Bdrap-1* is also analyzed on *B. divergens* isolates originating from French cattle.

Materials and methods

Babesia divergens isolates and in vitro culture

B. divergens Rouen 87 isolated from human was cryopreserved as infected gerbil blood stabilate in liquid nitrogen. This isolate was cultivated in vitro as described previously and cloned by the dilution limiting technique (clone Rouen 87 F5) (Chauvin et al., 2002; Malandrin et al., 2004). Eleven other *B. divergens* French isolates from cattle presenting acute babesiosis were adapted to in vitro culture, cloned under the same conditions (Table 1), and used for genetic variability analysis.

Production of monoclonal antibodies

B. divergens Rouen 87 was used for the production of monoclonal antibodies. Antigen consisted in gerbil (*Meriones unguiculatus*) infected blood (parasitemia of about 50%) washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS, pH 7.2), aliquoted and stored at -80°C until use. One seven-week-old female BALB/c mouse (21 g) was injected intraperitoneally with infected red blood cells (iRBC) (1×10^8 iRBC per injection) emulsified with Freund complete adjuvant (Sigma). Twenty five days later, an additional immunisation with the same antigen preparation emulsified with Freund incomplete adjuvant (Sigma) was given. The mouse was boosted three weeks later with a third inoculation of 1.10^8 iRBC in PBS into the tail caudal vein. Three days later, the mouse was sacrificed, and the spleen cells were fused with mouse myeloma X63-Ag8-653 cells (ECACC) in the ratio 5:1 using polyethylene glycol 1500 (Roche Diagnostics GmbH). Cells were plated with 3×10^5 cells/well in 96-well plates, and hybridomas were selected in RPMI 1640 medium containing HAT (Hybri-Max medium supplement, Sigma), 10% fetal calf serum (FCS, Lonza) and 10% BMH1 (Roche Diagnostics GmbH). Ten to fourteen day's later, hybridoma culture supernatants from the initial fusion and then from the subsequent limiting-dilution clones were screened for antibabesial activity by IFAT. Cells in *B. divergens* antibody-positive wells were cloned three times by limiting dilution. Class and subclass of immunoglobulins secreted in the culture supernatant were determined with a mouse monoclonal antibody isotyping kit (Sigma ImmunoChemicals). Cloned hybridomas were expanded for cryopreservation. Ascitic fluids were produced by injecting 2×10^5 hybridoma cells to pristane-primed BALB/c mice.

Table 1. *B. divergens rap-1* nucleotidic and amino acid variation among geographical distinct clones in France

Clone	French county origin	Nucleic acid position		Amino acid position				Identity to Rouen 87 F5		Genbank Accession Number
		Synonymous mutation		Non-synonymous mutation				Nucleotidic	Amino acid	
		231	984	73	183	217	224			
Rouen 87 F5	Seine Maritime	T	T	E	N	K	I	100%	100%	
1406B F10	Calvados		C		H			99.84%	99.76%	
1505B F14	Cantal				H			99.92%	99.76%	
1705A G10	Charente Maritime							100%	100%	
1802A G8	Cher							100%	100%	
2705A E11	Eure		C	D			V	99.76%	99.52%	
3601B E2	Indre							100%	100%	
4201B D4	Loire							100%	100%	
4903A D11	Maine et Loire							100%	100%	
5012A G3	Manche							100%	100%	
7904A G11	Deux Sèvres							100%	100%	
8706A E8	Haute Vienne	C				N		99.84%	99.76%	

Fourteen to 20 days later, ascitic fluids were collected from the peritoneal cavities of the mice and clarified by centrifugation. The mAbs were then purified from ascitic fluids by affinity chromatography using Hitrap Protein G HP column (GE Healthcare) and equilibrated with PBS by dialysis against it overnight at 4°C, and filter sterilized before use. Protein concentration was measured by the kit of BC Assay (Interchim).

Inhibition of B. divergens in vitro growth by monoclonal antibodies

As a further criterium to select hybridomas producing antibodies that recognize proteins involved in erythrocyte invasion, the effect of Mabs on the growth of *B. divergens* in vitro was analyzed. Culture medium containing Rouen 87 F5 infected RBC at a concentration of 1×10^4 iRBC/ml was prepared. The ascite purified IgG fractions of 4 Mabs specific to *B. divergens* were added at final concentrations ranging from 10 to 200 µg of protein per ml of culture medium depending on the mAb tested. Control cultures to which equivalent volumes of PBS have been added were included, and the inhibitory effect of non specific antibodies was tested by adding purified mouse IgGs (Serotec) within the same range of concentrations (50, 100 and 200 µg/ml). Aliquots (250 µl) of these culture suspensions were placed under standard in vitro cultivation conditions in 96-well culture plates. Each test well and corresponding control was done in triplicate. The culture medium was homogenized twice a day to improve antibodies access to sedimenting RBCs and merozoites. At the end of the experiment (control cultures reaching a parasitemia of about 15%), samples were taken from the RBCs to determine parasitemias on Giemsa-stained smears (2000 RBC counted). Each sample was tested in triplicate and the inhibitory assay was repeated twice with the same mAbs.

B. divergens erythrocyte invasion assay

The invasion assay described by Sun et al. (submitted) was used to collect the proteins present in the invasion medium in order to isolate the protein recognized by the Mabs for mass spectrometry analysis. Briefly, *B. divergens*-iRBCs (15 to 25% parasitemia) were resuspended in an equal volume of cytomix buffer (120mM KCl, 0.15mM CaCl₂, 2mM EGTA, 5mM MgCl₂, 10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH8.0, 25mM HEPES pH8.0) and subjected to electroporation with five intermittent high-voltage pulses (2.5kV, 200 Ω, 25µF) in 4-mm cuvettes (Gene Pulser,

Bio-Rad) every 10s with incubation at 0°C between pulses and washed twice with PBS to collect the free live merozoites. Invasion was initiated by addition of parasites to bovine erythrocytes in a synthetic medium (RPMI1640 + 1mM Ca²⁺) preincubated for 30min at 37°C with 5% CO₂ in air. The invasion medium was collected 10 min after the contact of parasites and prepared as previously described (Sun et al., submitted).

This assay was used to establish a subsequent culture with a synchronized developmental start in order to follow the transcription (RT-PCR semi-quantitative) and translation (immunofluorescence labelling) of the genes of interest in the course of the cell cycle.

Analysis of proteins contained in merozoite extracts and in the invasion medium

B. divergens merozoite extracts were prepared as previously described (Moreau et al., 2009). Briefly, merozoites were isolated by Percoll gradient separation and freeze-thawed once. They were treated with DNase (0.1mg/ml) (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France) for 1 h at room temperature and then with SDS (0.3%) (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France) and the supernatant was collected. Proteins in the supernatant of merozoite extracts, in the crude merozoite extracts and in the concentrated invasion medium described above were separated on a 12% SDS-PAGE gel, and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The blots were blocked with 10% skimmed milk in TBS/0.1% Tween 20 (TBSt) for 1 h, incubated in hybridoma culture supernatants (5D6, 2D11, 4D11, 6F12) for 1 h, and then incubated with anti-mouse IgG coupled to alkaline phosphatase (Sigma Aldrich), diluted 1/1000 in TBSt with 5% skimmed milk for 30min. After each incubation, all washes were done three times for 5min in TBSt. The colorimetric reaction was carried out for 5 min with BCIP/NVT liquide substrate system (Sigma Aldrich).

Protein identification by mass spectrometry

The protein recognised by the Mab4D11 was identified by means of electrospray ionisation tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). The corresponding protein band on the stained gel was excised and in-gel digested essentially as described previously (Devouge et al., 2007). The resulting peptide mixture was introduced into a nanoscale capillary liquid chromatography system (Switchos-Ultimate II capillary LC system, LC Packings/Dionex, Amsterdam, the

Netherlands) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF Global, Waters, Manchester, UK). Chromatographic separation was conducted on a reverse-phase capillary column (Pepmap C18, 75-mm x 15-cm, LC Packings) with a linear gradient from 2% to 40% (v/v) acetonitrile in 50 min, followed by an increase to 50% acetonitrile within 10 min, at a flow rate of 200 nL min⁻¹. Mass-data acquisitions were piloted by the Mass Lynx software (Micromass/Waters) using the “survey scan” mode: MS data were recorded for 1 s on the mass-to-charge (m/z) range 400–1500, after which the three most intense ions (doubly or triply charged ions) were selected and fragmented in the collision cell (MS/MS measurements).

Databank searching from LC-MS/MS data.

Raw data were processed by means of the Protein Lynx Global Server v. 2.1 software (Waters). Protein identification was performed by comparing the collected LC-MS/MS data against Uniprot databank (release from August, 10, 2010, containing 12 155 553 sequences). The mass tolerance was set at 150 ppm for parent ions (MS mode) and 0.3 Da for fragment ions (MS/MS mode), and one missed cut per peptide was allowed. Databank searches were performed through the use of the Mascot server v. 2.2 program (Matrix Science). Results were further fed into the OVNIP program (Tessier et al. 2010) for proteins validation. Validation of proteins was performed by setting the requirements to a minimum of two unique peptides matching the databank sequence with individual MASCOT ion scores above the significance threshold (threshold score of 40, $p < 0.05$).

Full sequencing of rap-1 among 12 isolates of B. divergens

Full sequences of *Bdrap-1* were obtained from Rouen 87 F5 and 11 other clonal lines of *B. divergens* (bovine cases of acute babesiosis) selected according to their geographical origin and cultivated in cattle RBC. Infected erythrocyte pellet was frozen at -20°C in an equal amount of PBS. Genomic DNA (gDNA) was purified from parasitized RBCs using Promega Wizard gDNA purification kit (Promega, France). *Bdrap-1* gene was amplified from the genomic DNA with the primers rap-1 F2 and rap-1 R2 (Table 2) designed according to the published sequence (Skuce et al., 1996).

Table 2. Nucleotide sequence of PCR primers used for amplification and sequencing of *B. divergens* genes

Amplified gene	Primer name	Primers (5'-3')	Size of fragment amplified from cDNA	Size of fragment amplified from gDNA	Reference
<i>Bdrap-1</i>	rap-1F2	ATGAAGGGATTCTCAAGGATTGT	1242bp	1242bp	In this study
	rap-1R2	TTAAACGAATTCGCCCTTA			
Partial RNAr	BABGF2	GYTTTGTAATTGGAATGATGG	559bp	559bp	Bonnet et al., 2007
18S	BABGR2	CCAAAGACTTTGATTTCTCTC			
Partial Beta-tubulin	β -tubF2	ATCGGTGCCAAATTCTGGGAG	200bp	360bp	In this study
	β -tubR2	CCGAAAGGTCCTGCGCGC			
M13 cloned	M13F	GTAAAACGACGGCCAG		1408bp	Invitrogen
<i>Bdrap-1</i>	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC			

The *Bdrap-1* gene was then cloned into the pCR4-TOPO plasmide (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen), transformed into TOP10 *E. coli* cells. Plasmids were extracted and sequenced using M13 primers (Table 2). For each *B. divergens* clonal line, complete sequences from a minimum of 8 different colonies were obtained (Sequencing Platform of BioGenOuest, Nantes, France). The sequences were aligned using the software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The presence and location of potential introns was controlled by RT-PCR and by sequencing the amplification products using primers rap-1 F2 and rap-1 R2 (performed on Rouen 87 F5) (Table 2).

Phylogenetic analysis among Babesia species

Fourteen RAP1 sequences from 7 *Babesia* species were aligned using the CLUSTALW2 software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Amino-acid, rather than nucleotide sequences were used because of the high divergence between the sequences. The 322 first amino-acid positions were easily aligned (only 9 insertion-deletions were observed in this reduced data set) and were kept for subsequent analysis. The remaining part of the alignment was not used because of the poor confidence we have on the alignment. The phylogenetic tree was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test is indicated on

each nod (10000 replicates) (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method (Zuckerkanndl and Pauling, 1965). All positions containing alignment gaps and missing data were eliminated only in pairwise sequence comparisons (Pairwise deletion option). Phylogenetic analyses were conducted using MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Sub-cellular localization by Electron Microscopy (EM)

In order to localize the protein recognized by the selected Mab, bovine infected RBCs were fixed at room temperature for 10 min in 4% paraformaldehyde/0.05% glutaraldehyde in 0.2 M sodium phosphate buffer, washed in the same buffer and pelleted. The pellet was then dehydrated in ethanol, infiltrated overnight at -20°C in LR White resin which was then polymerised at 37° C for 5 days. Ultrathin sections were floated successively on 2.5% milk in PBS containing 0.01% Tween 20 (PBSTM), Mabs pure hybridoma culture supernatants, goat anti-rat IgG (H+L) serum diluted 1:200 in PBSTM, 10 nm Protein A-gold diluted 1:50 in PBS, with 5x3 min washes in PBS containing 0.01% Tween 20 between each step. Sections were finally stained with 2% uranyl acetate in water, followed by lead hydroxide for 2s, and observed with a JEOL 1200EX II electron microscope.

Expression of Bdrap-1 following invasion

Expression of *Bdrap-1* at the transcriptional and translational levels was monitored on cultures started synchronously after an invasion test.

RT-PCR was performed with erythrocytes collected from 30 min to 9 hours after the initial contact between parasites and RBC to follow the timing of transcription of the gene coding the protein recognised by Mab 4D11. The in vitro invasion of *B. divergens* was performed as described (Sun et al., submitted) and erythrocyte pellets were collected at 7 time points (30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 9h) for RNA extraction. Briefly, 20µl erythrocyte pellet was added into 500µl Trizol (Sigma), and kept at the room temperature for 10 min. Chloroforme (100µl) was added to the samples, and centrifuged to separate proteins, DNA and RNA. The RNA in the upper layer was precipitated by isopropanol, washed twice with 75% ethanol, rehydrated in

DEPC-treated water. The RNA was retrotranscribed into cDNA with Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer guidelines. *rap-1* gene was amplified from cDNA to observe the timing of transcription. Partial rRNA 18S gene and partial Beta-tubulin gene were also amplified as constitutively transcribed house-keeping genes using the primers described in Table 2.

To observe the timing of BdRAP-1 expression in the parasite, a double immunolabelling directed against RAP-1 and whole parasite was performed on the erythrocyte pellets described above, collected from 1h to 9h after the contact between RBC and parasite. The pellets were washed with 0.2M sodium phosphate pH7.4, diluted 1/100 in the same buffer, and deposited on a polylysine-treated slide (Electron Microscopy Science). The samples were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science) at 4°C for 10 min, and then blocked overnight at 4°C with 10% goat serum in PBS containing 0.2% Tween-20 (PBST). After that, the samples were incubated with pure culture supernatant of selected Mab at 37°C for 1 hour. After being washed with PBST, the slides were incubated for one hour at room temperature with an Alexa fluor 488 conjugated goat anti mouse antibody (1/400, Invitrogen Life Technologies, CA). Before the incubation with the 2nd primary antibody, the samples were fixed and blocked again, then incubated for one hour at 37°C with a serum from a rabbit immunised with *B. divergens* merozoite extracts (1/800 in PBST). After being washed with PBST samples were incubated for one hour at room temperature with an Alexa fluor 555 goat anti-rabbit conjugate (1/400, Invitrogen, Life Technologies, CA). The slides were coverslipped with Mowiol medium (CalbiochemEMD Biosciences, San Diego, CA) and serially scanned with a confocal microscope (Nikon C1, Champigny sur Marne, France) using the argon ion laser (488 nm) to observe RAP1 immunolabelling and the 543 nm helium neon laser to observe whole parasite immunolabelling.

Results

Inhibition of B. divergens in vitro growth by monoclonal antibodies

The Mabs produced were first analyzed by IFAT and selected when they recognized either the surface of the parasite (5D6) or its apical part (2D11, 4D11 and 6F12). Antibodies produced by these Mabs were purified from ascitic fluids to test their effect on *B. divergens* growth. A preliminary experiment was performed to adjust inhibitory concentration for each Mabs. Significant and dose-dependent growth inhibition was observed with Mab, compared to the non-specific mouse IgG control (Figure 1). A complete growth inhibition was observed for concentration as low as 25 $\mu\text{g/ml}$ medium for 5D6, and between 100 to 200 $\mu\text{g/ml}$ for the three others.

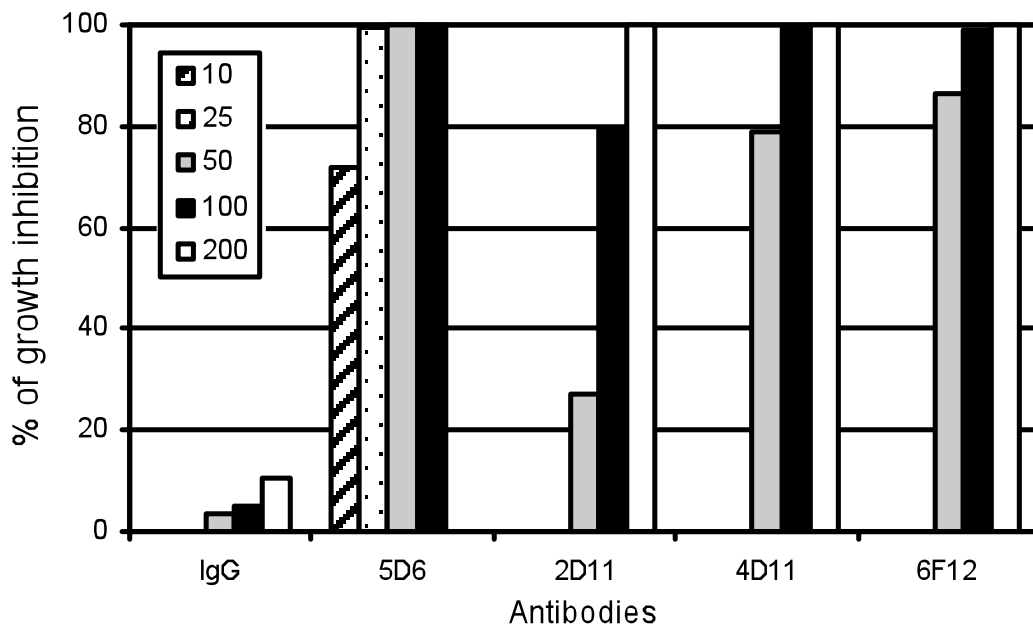


Figure 1. Inhibition of *B. divergens* growth by Mabs. Different concentrations (10 to 200 $\mu\text{g/ml}$) of Mabs and mouse IgG (control) were added to the culture medium. Parasitemia was counted to evaluate the inhibition effect on growth. Each data represents the mean of three replicates from which the mean of the replicate control was deduced.

Identification of proteins recognized by these Mabs

Three Mabs (2D11, 4D11 and 6F12) recognized a protein of 47 kDa, while 5D6 recognized a protein of about 37 kDa (Figure 2A). The 47 kDa protein was also detected by 4D11 in total merozoite extract (Figure 2B) as well as in the invasion medium (Figure 2C).

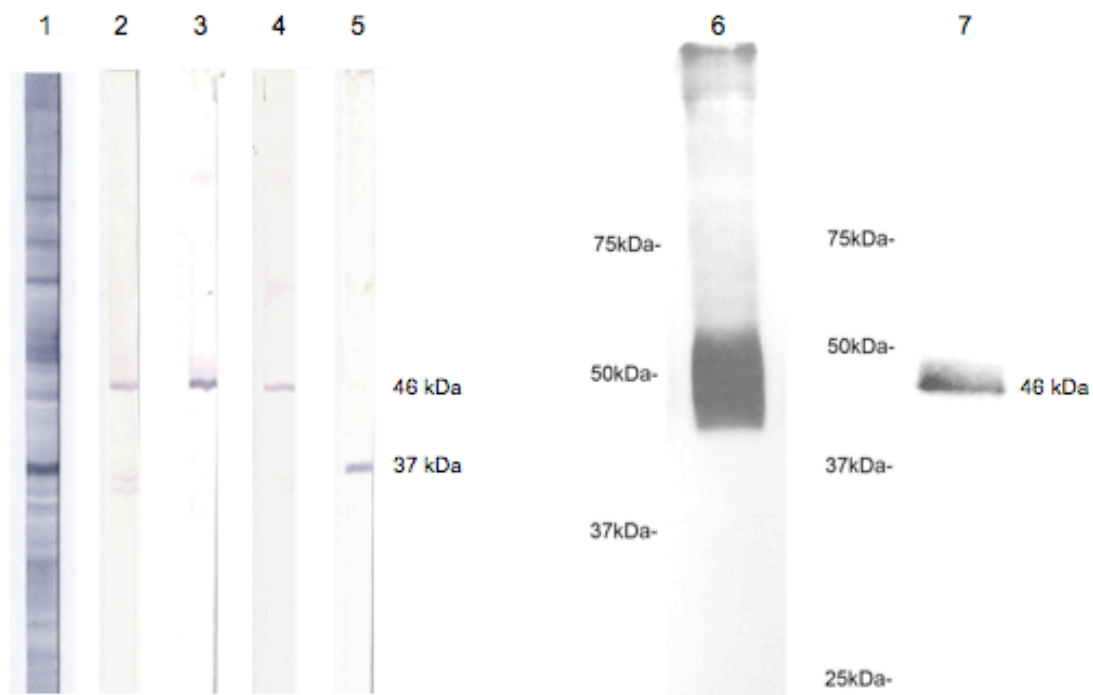


Figure 2. Proteins collected in the supernatant fraction of lysed merozoite were recognized by sera from experimentally infected sheep (lane 1), Mabs 2D11 (Lane 2), 4D11 (Lane 3), 6F12 (Lane 4) and 5D6 (Lane 5) by Western blotting. A 47 kDa protein was also recognized by the Mab 4D11 on total merozoite extract (lane 6) and medium invasion proteins (lane 7) The bars on the left of each photograph indicate the molecular masses of standard markers.

The corresponding protein band in the merozoite extract was digested from the gel by trypsin and the resulting peptide mixture analysed by mass spectrometry. This led to the identification of Uniprot entry Q17129 (Table 3), annotated as BdRAP-1 protein reported by Skuce et al. (1996), with 5 unique peptides measured by MS/MS spectrometry matching this sequence with a significant MASCOT score ($p < 0.05$). The sequence of 3 peptides (40 amino acids identified) from the 37 kDa matched *B. divergens* Genbank deposited sequence of Bd37 (Uniprot entry Q8T117).

The expected (RAP-1 in (Skuce et al., 1996) or known (Bd37 in (Delbecq et al., 2002) molecular weights of these two proteins were respectively of 46 kDa and 37 kDa, corresponding to the molecular weights obtained from our analysis.

Table 3. Identification of proteins analysed by mass spectrometry

Entry	Protein name	MW	pI	Nb peptides	Nb unique peptides	Score	Seq coverage	Peptide sequence	Mr(expt)	Mr(calc)	Mr(expt) - Mr(calc) (ppm)	Peptide score	E-value
Q8T117	Glycosylphosphatidylinositol-anchored merozoite surface protein OS=Babesia divergens	36431	5.23	2	2	157	7%	K.GTVESQAQGTDSSEELK.T K.LESSEVPANLK.A	1185.69 1636.85	1185.62 1636.74	60.7 70.9	64 93	7.0E-03 7.5E-06
Q17129	Rhoptry associated protein OS=Babesia divergens	46445	9.03	7	6	398	15%	K.NFFKDGIR.K K.TYLILDITTK.V K.SSLGDLHGP.K.A K.MLNEKIPVV.K.N K.MLNEKIPVV.K.N Oxidation (M) K.TMDNMIAHLSTR.S K.TMDNMIAHLSTR.S	995.54 1066.66 1122.64 1169.71 1185.71	995.51 1066.59 1122.60 1169.68 1185.67	26.5 69.7 32.7 24.0 28.0	43 53 67 (48) 58	7.6E-01 6.6E-02 3.5E-03 2.5E-01 2.5E-02
									1388.72 1535.86	1388.65 1535.79	50.0 44.5	77 100	3.9E-04 1.5E-06

Rouen 87 F5 complete sequence of Bdrap-1

The complete *Bdrap-1* gene was amplified and sequenced for Rouen 87 F5 with primers designed according to the published sequence (Table 2).

An open reading frame of 1242 bp (Genbank accession number XXX) was sequenced and compared to the 1224 bp for the *B. divergens rap-1* sequence Z49818. Comparison of the *Bdrap-1* cDNA lengths and sequences obtained by RT-PCR with those of the PCR-amplified whole genes indicated the absence of introns in *Bdrap-1* gene (Figure 6), giving a protein consisting of 413 amino acids, compared to 408 for the *B. divergens rap-1* sequence Z49818. The alignment of the two amino acid sequences is presented in Figure 3. Distinctive features of the RAP-1 family were conserved in this new sequence : a signal peptide sequence, the four conserved cysteine residues as well as the LPNPYQLDAAF and YKTYL conserved motifs. Amino acid identity between these two *Bdrap-1* sequences was high (90.1%) with a perfect conservation of the first N-terminal 100 residues.

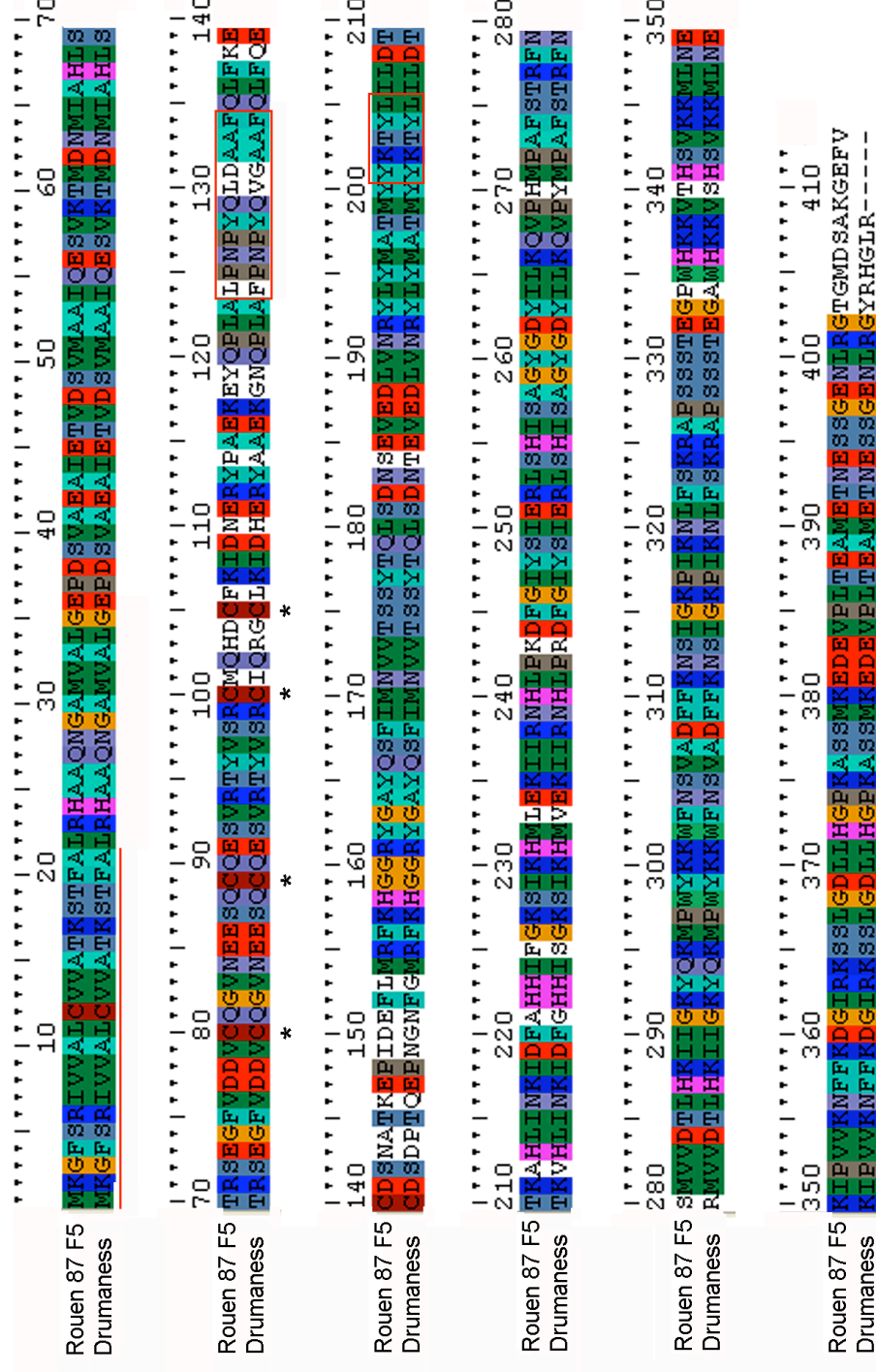


Figure 3. Alignment and analysis of the predicted amino acid sequence of BdrAP-1 proteins from *B. divergens* clones Rouen 87 F5 (Genbank XXXX) and Drumanness (Genbank Z49818). Identical amino acids are represented by a colour background. N-terminal signal peptide are underlined. The conserved cysteines are marked by stars. The motifs conserved within RAP-1 family are indicated by a red frame.

Phylogenetic relationships of RAP1 between the *Babesia* sequences were investigated

Rouen 87 F5 BdRAP-1 was aligned with RAP-1 sequences known for *B. bovis* (Suarez et al. 1998), *B. bigemina* (Suarez et al., 2003), *B. caballi* (Kappmeyer et al., 1999; Bhoora et al., 2010), *B. ovis* (Dalrymple et al., 1993), *B. canis* (Dalrymple et al., 1993) and *B. gibsoni* (Zhou et al., 2007; Terkawi et al., 2009). The two *B. bigemina* sequences (RAP-1b and RAP-1c) are highly divergent from the remaining *Babesia* species (Figure 4).

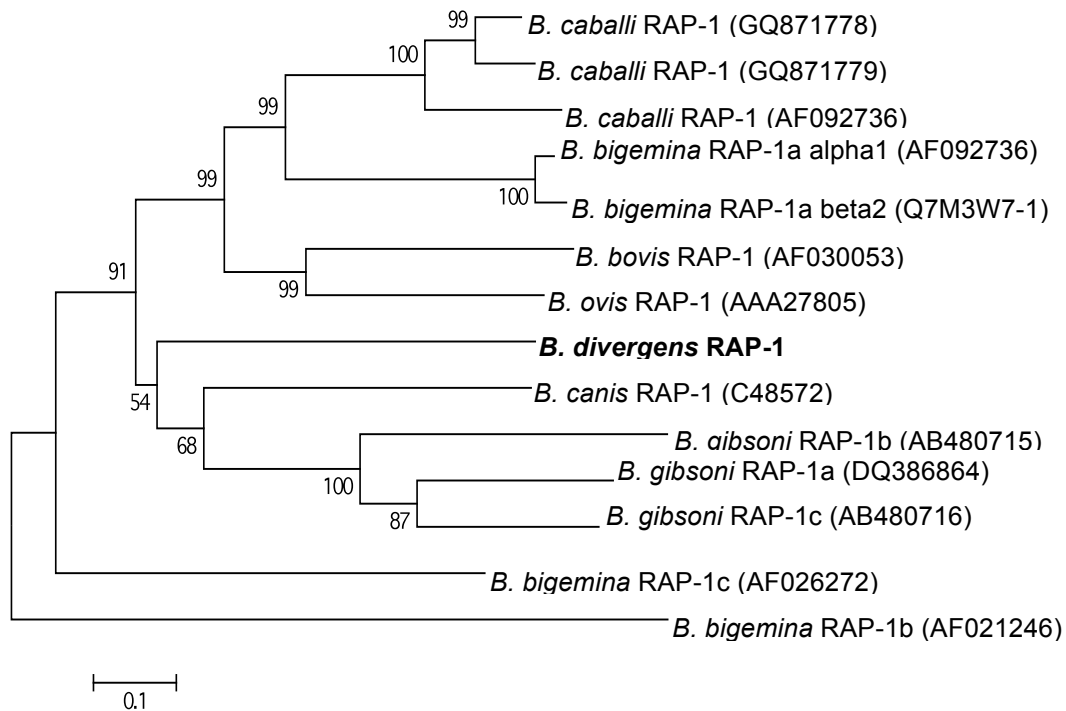


Figure 4. Phylogenetic tree of 14 RAP-1 sequences from 7 *Babesia* species. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (10000 replicates) are shown next to the branches and accession numbers are indicated between parentheses. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing alignment gaps and missing data were eliminated only in pairwise sequence comparisons (Pairwise deletion option). There were a total of 322 positions in the final dataset, corresponding to the 322 first amino-acid positions of the alignment (including only 9 insertion-deletions). The mid-point rooting method was used (*id est*, the root is placed at the mid-point of the longest distance between two taxa of the data set). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4.

The three sequences of *B. caballi* and of *B. gibsoni* form two monophyletic groups, each supported by high bootstrap values (100%). The sequence of *B. ovis* and *B. bovis* form another monophyletic group (bootstrap value of 100%), being the sister group of the *B. caballi* clade. *B. canis* is the sister group of the *B. gibsoni* clade. With the [*B. canis* + *B. gibsoni*] group and the [*B. bovis* + *B. ovis* + *B. caballi*] group, the *B. divergens* sequence form a third group, with unresolved relationship between those three groups.

B. divergens RAP-1 is located in the merozoite rhoptry bulb

Localization of proteins can often reveal clues to their function. Bd37 is a merozoite surface protein with a putative function in adhesion to RBC. RAP-1 family members are known to be localized in the rhoptry with putative functions in erythrocyte invasion. Localization of proteins recognized by the selected Mabs was attempted using electron microscopy. Two of these Mabs (5D6 and 6F12) were apparently not suitable for electron microscopy and localization of corresponding antigens could not be achieved. Mabs 2D11 and 4D11 gave the same pattern of localization. Results obtained with Mab 4D11 are shown in Figure 5 where apical organelles including three rhoptries were visualized. Multiple spots could be detected at the apical pole of the merozoite, localized in the bulb of the rhoptry, but not in the rhoptry duct.

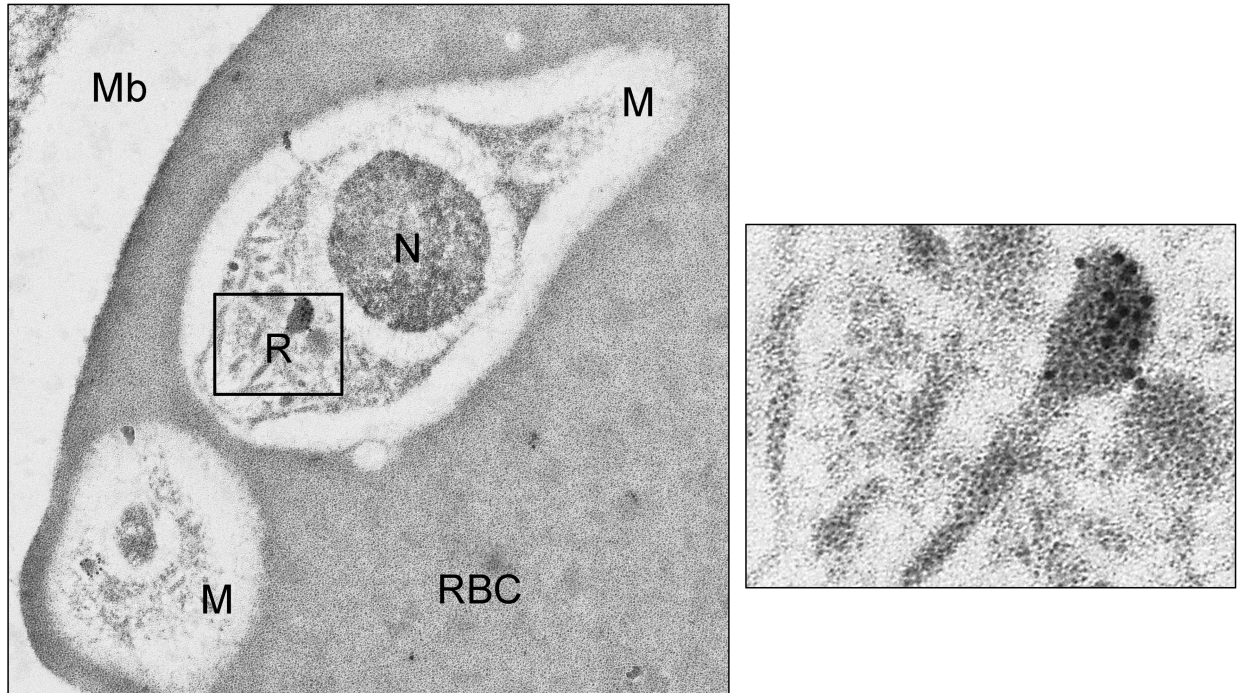


Figure 5. Specific localization of BdRAP-1 in the bulb of the rhoptry of intra-erythrocytic merozoite by immuno-electron micrographic analysis using Mab 4D11. M, merozoite; Mb, membrane; N, nucleus; R, rhoptries.

Expression of RAP-1 after a synchronized invasion start

The timing of transcription of *Bdrap-1* was investigated by RT-PCR. RNAr 18S gene and Beta-tubulin gene were selected as reference genes. Primers were designed to amplify partial sequences of these two genes (Table 2). The Beta-tubulin primers located on two different exons were planned to amplify the intron between them, and constituted a control for gDNA contamination in the cDNA. A 200bp fragment was obtained from cDNA samples proving the absence of gDNA in the RNA extract, while a fragment of 366bp was amplified from gDNA (Figure 6). Transcription of *Bdrap-1* was monitored during the first generation following a synchronized culture start, at 6 time points (30 min, 1, 2, 4, 6 and 8h). *Bdrap-1* transcripts were present throughout the entire cell cycle, but transcription level increased 2 hours after the erythrocyte invasion. As expected, the intensity of amplified product of RNAr 18S and beta-tubuline remained constant for the same time period.

The expression of *rap-1* was followed by IFAT 1, 3, 4, 6, 8 and 9h after the *in vitro* invasion (Figure 7A). A *B. divergens* rabbit antiserum directed against merozoites was used to label the whole parasite (Figure 7Aa) and Mab 4D11 to specifically label BdRAP-1 (Figure 7Ab).

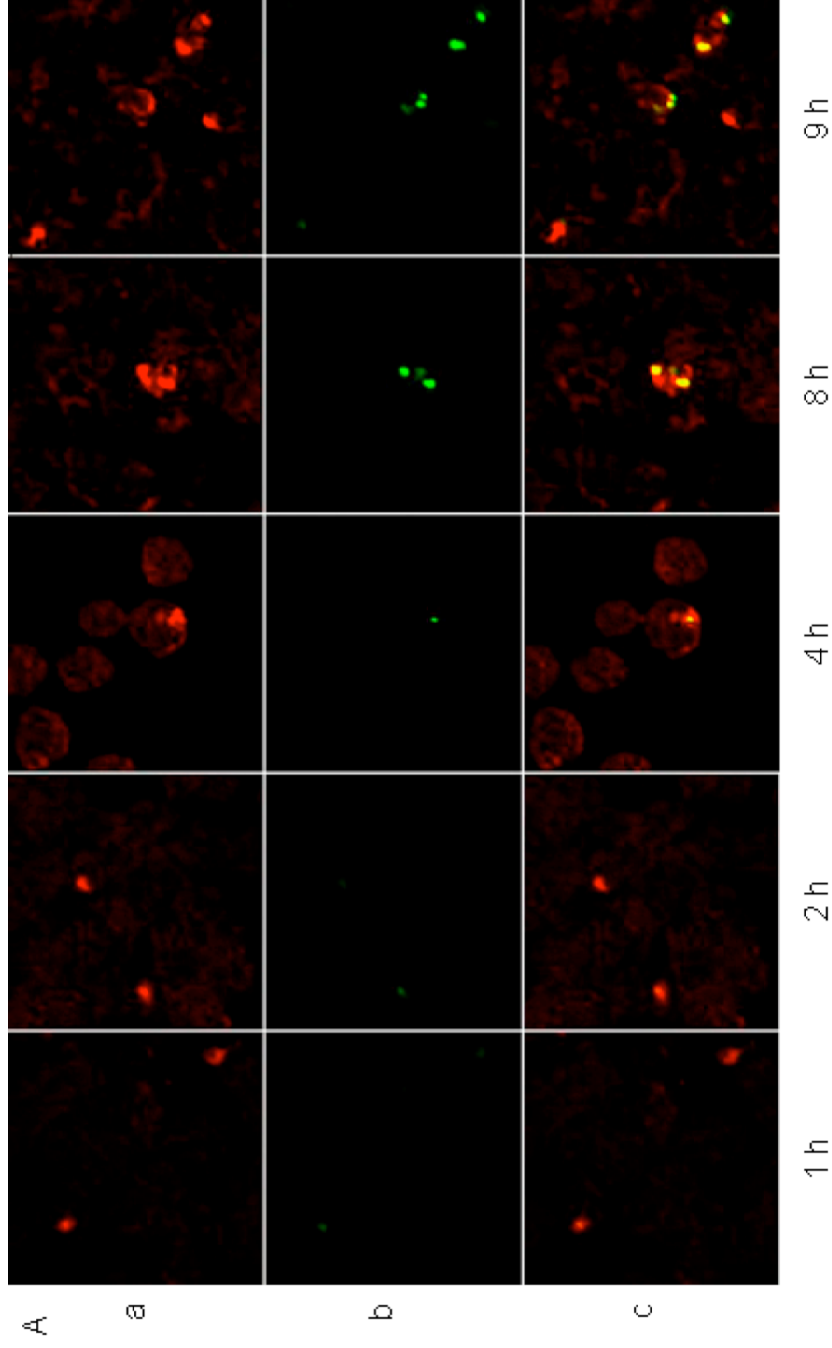


Figure 7. A). Immunohistochemical analysis of BdRAP-1 expression in the course of the erythrocytic development of *B. divergens*. Erythrocyte pellets collected 1, 2, 4, 6, 8, 9h (from left to right) after the initial contact between RBC and parasites were incubated with immune serum against *B. divergens* (red) and Mab 4D11 against BdRAP-1 (green). Panels in the column a show anti-*B. divergens* staining; panels in the column b show anti-BdRAP-1 staining. Panels in the column c are overlay images. The spots of different intensity in panels “9 h” represent parasites from two successive generations.

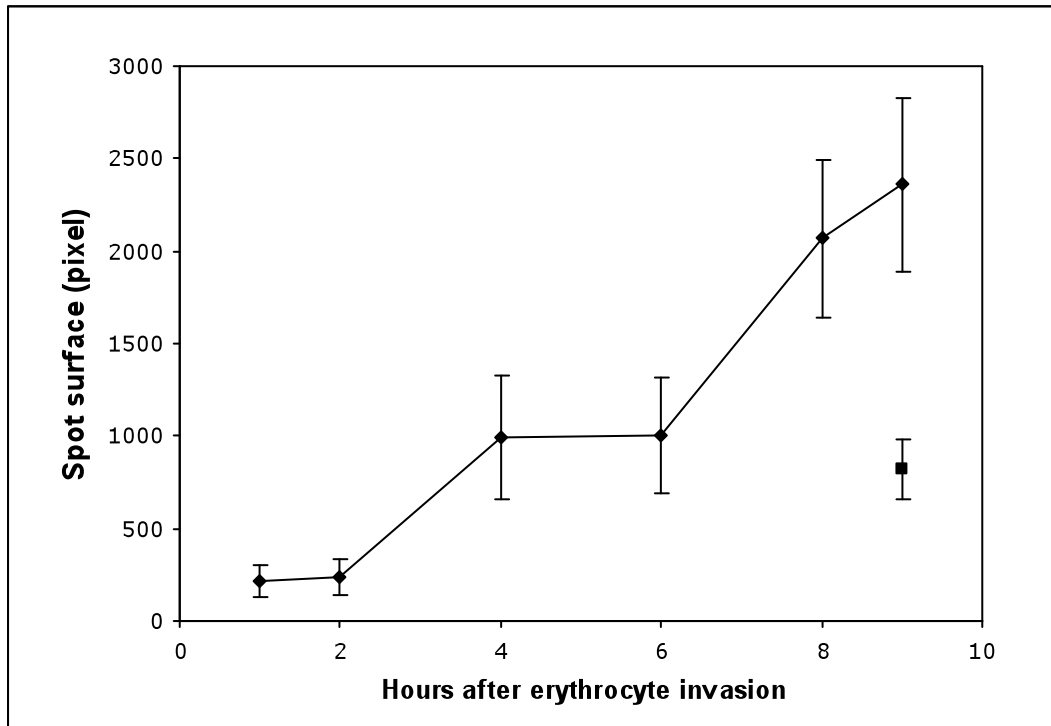


Figure 7B). The intensity of fluorescence labelled by Mab 4D11 was followed at different time points after erythrocyte invasion. The second generation appeared 9h after invasion and is presented separated from the first generation. Each figure represents the average value of the intensity of minimum 20 fluorescence spots and error bars indicate the standard deviation.

Labelling of intraerythrocytic *B. divergens* with 4D11 was observed at all time points, and even the young trophozoites were weakly labelled 1 h after their invasion of the erythrocyte. The intensity of labelling in parasites increased steadily after invasion from 2 hrs on (Figures 7A and B), with a 4-fold increase at 4 and 6 hrs post-invasion and a 10-fold increase afterwards (Figure 7B). As measurements were made on individual spots, it means a 20-fold increase between a young trophozoite (one spot) and a geminate form (2 spots). Intense signals could be seen after parasite cell division on the apical pole of each merozoite. At the end of the first parasite generation (about 9 hrs after the invasion), trophozoites from the second generation could be seen among geminate forms from the first generation, highlighting the fluorescence intensity differences related to RAP-1 between these two stages. These two populations could be easily differentiated as shown on Figure 7A. Thus RAP-1 was detected throughout *B. divergens* life cycle, but its expression increased greatly at the end of the cell division process.

The rap-1 gene is conserved among distinct B. divergens clonal lines

To determine whether sequence variation exists in *Bdrap-1* among *B. divergens* isolates, blood samples from cattle experiencing bovine babesiosis all over the France were collected and cultivated. Eleven isolates were chosen according to their geographic location and cloned. The *rap-1* gene was amplified by PCR, cloned into TOPO TA vector and a minimum of 8 clones were sequenced for each *B. divergens* clonal lines. An open reading frame of 1242 bp was obtained for all the strains tested, and the conceptual translated protein comprises 413 amino acids with a predicted molecular mass of 46kDa. Sequence analysis of *rap-1* from these *B. divergens* clonal lines revealed a very strong sequence conservation : among the 11 clonal lines analysed, sequences of *rap-1* were found identical to Rouen F5 *rap-1* for 6 of them (Table 1). Changes were otherwise limited to one or two changes per sequence (2 synonymous, 4 non-synonymous over the 11 sequences).

Discussion

As described for Apicomplexan parasites, *Babesia divergens* successful invasion of the erythrocyte involves merozoite surface proteins for the erythrocyte attachment step as well as the apical complex machinery (micronemes and rhoptries) for the internalization step. Two different *B. divergens* proteins with a role in erythrocyte adhesion have been characterized: the merozoite surface antigen Bd37 (Delbecq et al., 2002; Delbecq et al., 2008) and BdAMA-1 (Montero et al., 2009). On the other hand, very little is known about the molecules involved in subsequent steps of invasion and localized in the apical complex organelles. In this study, we aim at characterizing such proteins by screening monoclonal antibodies produced against merozoites for features such as surface or apical localization of the recognized antigens and the ability of the selected Mabs to inhibit *B. divergens* growth.

Among the four selected Mabs, one, called 5D6, recognized the merozoite surface antigen Bd37. The role of Bd37 in erythrocyte invasion was confirmed here by the efficiency of the Mab to inhibit *B. divergens* in vitro growth.

The three other Mabs were also able to efficiently inhibit *B. divergens* in vitro growth and were directed against the same protein of 47 kDa. Mass spectrometry analysis of this protein identified in the database the already sequenced BdRAP-1 with a predicted molecular weight of 46 kDa (Skuce et al., 1996). *Bdrap-1* sequence of Rouen 87 F5 from our study possessed the typical features of a RAP-1 family member : an hydrophobic N-terminal export signal, four conserved cysteine residues, a highly conserved 14 amino acids sequence in the amino half of the protein, several other conserved oligopeptide motifs in the first 300 amino acids of the molecule and tandemly-arranged multicopy genes (Dalrymple et al., 1993; Skuce et al., 1996; Suarez et al., 1998; Kappmeyer et al., 1999; Suarez et al., 2003; Zhou et al., 2007; Terkawi et al., 2009). For *B. divergens*, the presence of at least three genes was estimated, belonging to two divergent classes, one of which clearly lies outside the cluster of all the sequences determined at that time (Dalrymple et al., 1996). Rouen 87 F5 Bdrap-1 and Drumaness Bdrap-1 (Skuce et al., 1996) most probably represent genetic variants of the same gene, since they share 95.9 % identity at the nucleotide level and 90.1 % at the amino acid level. Neither of them belong to the class A (one copy of this gene) or B (two copies of this

gene) described by Dalrymple et al. in 1996 for the *B. divergens* Hullman strain. The presence of 4 different copies of *Bdrap-1* is thus possible. It is anyway surprising that the *Bdrap-1* gene described here had not been amplified with the primers used by Dalrymple et al. in 1996 since they were designed in regions perfectly conserved in *Bdrap-1* sequence of Rouen 87 F5. Further investigations on the *Bdrap-1* locus arrangement are necessary, but a complexity similar to the one described for *B. bigemina* can be expected. On the other hand, genetic polymorphism of *Bdrap-1* gene characterized in our study reveals an essentially monomorphic gene, with variation that appears to reflect only point mutation, as described for *B. bovis rap1-a* (Suarez et al., 1998). Such a conservation suggests functional constraints on this gene.

Electron microscopy analysis performed with two Mabs (2D11 and 4D11) confirmed the localization of BdRAP-1 in the apical pole of the merozoite, more specifically in the bulb of the rhoptry. Secretion of RAP-1 in the course of the invasion process has not always been evidenced. In *B. gibsoni*, BgRAP-1b and BgRAP-1c were apparently restricted to within the parasite while BgRAP-1a could be secreted in the culture supernatant and in the cytoplasm of the infected erythrocyte (Terkawi et al., 2009). We do not have clear evidence that BdRAP-1 described here is secreted. Its detection in the invasion medium could indeed be explained by parasite lysis. However, the detection of this protein by sera from experimentally infected animals (Sun et al., submitted), but more importantly the *B. divergens* growth inhibition observed with BdRAP-1 Mabs are strongly indicative of its secretion in the culture supernatant.

The inhibition of the parasite attachment to the erythrocyte, the invasion or the in vitro growth by anti-RAP-1 antibodies has been demonstrated for *B. bigemina* (Figuroa and Buening, 1991) and *B. bovis* RAP-1a (Mosqueda et al., 2002; Yokoyama et al., 2002). The attachment of *B. bovis* sporozoites to erythrocytes was also inhibited by anti-RAP-1 antibodies (Mosqueda et al., 2002) indicating shared targets of antibody mediated inhibition of erythrocyte invasion. In our study, we also demonstrate the inhibitory effect of three anti-RAP-1 Mabs on *B. divergens* in vitro growth. These observations strongly support that RAP-1 proteins have important functional role in erythrocyte invasion. Immunization with *B. bigemina* ou *B. bovis* RAP-1 induced a predominant type 1 immune responses in cattle (Ruef

et al., 1997, Norimine et al, 2003) and a partial protection against challenge infection was observed with native or recombinant form of these antigens (McElwain et al., 1991; Wright et al., 1992; Brown et al., 1998, Fish et al, 2008). Nevertheless, the degree of these partial protection depends on adjuvant used and the challenge applied (Norimine, et al., 2003). According to these results, RAP-1 seems to be an interesting candidate for inclusion in subunit vaccines against *Babesia sp.* The monomorphic nature of *Bdrap-1* is an advantage for such applications. RAP-1 role in invasion may not to be limited to erythrocyte, since expression analysis demonstrated its presence in other tick stages (sexual stages and kinetes) of *B. bigemina* (Vichido et al., 2008).

In our study, BdRAP-1 was detected in the different developmental stages of the parasite following invasion (trophozoite to fully divided merozoites). This was also observed for *B. bovis* RAP-1a (Yokoyama et al., 2002) and the three *B. gibsoni* RAP-1 (Terkawi et al., 2009). RT-PCR indicated that even if *Bdrap-1* transcripts were present early after invasion, their level increased in the course of the intra-erythrocytic cell cycle, at a period (between 3 and 4 hours after the invasion) corresponding to the onset of cell division (Sun et al., submitted). A transcriptional regulation of *Bdrap-1* gene can thus be postulated, probably in relation with cell cycle events such as cytokinesis and the formation of rhoptries at the poles of each of the daughter cell. This increase of BdRAP-1 transcript level observed between 1 and 2 hours after erythrocyte invasion is followed by an increase of RAP-1 expression, a 4-fold raise being observed between 2 and 4 hours after invasion. The plateau in RAP-1 fluorescence intensity observed between 4 and 6 hours after invasion probably reflects the separation of the initial spot of the trophozoite into two “daughter” spots of lower intensity each, due to the cell division and the formation of two sets of rhoptries. RAP-1 expression probably increased more regularly from 2 hours after invasion up to the exit of the mature merozoites from the erythrocyte.

In summary, we have characterized one BdRAP-1, used Mabs directed against BdRAP-1 to demonstrate their ability to inhibit *B. divergens* in vitro growth and thus the role of BdRAP-1 in invasion, its localization in the rhoptry bulb by electron microscopy and its expression at all intra-erythrocytic stages. *Rap-1* gene was shown to be regulated at the transcriptional level with an upregulation corresponding apparently to the onset of parasite cellular division.

Accumulation of BdRAP-1 increases considerably in the course of the intra-erythrocytic development. Analysis of *Bdrap-1* genetic polymorphism revealed the monomorphic nature of this gene among French isolates. The characterization of *B. divergens rap-1* locus structure and of each of the other *rap-1* genes should help understanding their relative function in merozoite invasion.

Acknowledgments

This work was supported by research funds from the Institut National de la Recherche Agronomique, and ONIRIS. Y. Sun's PhD thesis is financed by Region Pays de Loire. We wish to acknowledge the group IECM for allowing access to the electroporation apparatus.

References

- Brown, W.C., McElwain, T.F., Hotzel, I., Suarez, C.E., Palmer, G.H., 1998. Helper T-cell epitopes encoded by the *Babesia bigemina* rap-1 gene family in the constant and variant domains are conserved among parasite strains. *Infect Immun* 66, 1561-1569.
- Brown, W.C., Palmer, G.H., 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Today* 15, 275-281.
- Carruthers, V.B., Giddings, O.K., Sibley, L.D., 1999. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol* 1, 225-235.
- Chauvin, A., Valentin, A., Malandrin, L., L'Hostis, M., 2002. Sheep as a new experimental host for *Babesia divergens*. *Vet Res* 33, 429-433.
- Dalrymple, B.P., Casu, R.E., Peters, J.M., Dimmock, C.M., Gale, K.R., Boese, R., Wright, I.G., 1993. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. *Mol Biochem Parasitol* 57, 181-192.
- Dalrymple, B.P., Peters, J.M., Bose, R., Wright, I.G., 1996. A polymerase chain reaction method for the identification of genes encoding members of the Bv60/p58 family of rhoptry protein homologues in the genus *Babesia*. *Exp Parasitol* 84, 96-100.
- Delbecq, S., Precigout, E., Vallet, A., Carcy, B., Schetters, T.P., Gorenflot, A., 2002. *Babesia divergens*: cloning and biochemical characterization of Bd37. *Parasitology* 125, 305-312.
- Delbecq, S., Auguin, D., Yang, Y.S., Lohr, F., Arold, S., Schetters, T., Precigout, E., Gorenflot, A., Roumestand, C., 2008. The solution structure of the adhesion protein Bd37 from *Babesia divergens* reveals structural homology with eukaryotic proteins involved in membrane trafficking. *J Mol Biol* 375, 409-424.
- Devouge, V., Rogniaux, H., Nesi, N., Tessier, D., Gueguen, J., Larre, C., 2007. Differential proteomic analysis of four near-isogenic *Brassica napus* varieties bred for their erucic acid and glucosinolate contents. *J Proteome Res* 6, 1342-1353.
- Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D., Joiner, K.A., 1993. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res* 79, 402-408.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39.

- Figueroa, J.V., Buening, G.M., 1991. In vitro inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 29, 997-1003.
- Fish, L., Leibovich, B., Krigel, Y., McElwain, T., Shkap, V., 2008. Vaccination of cattle against *B. bovis* infection with live attenuated parasites and non-viable immunogens. *Vaccine* 26 Suppl 6, G29-33.
- Kaneko, O., 2007. Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the *Plasmodium* rhoptry. *Parasitol Int* 56, 255-262.
- Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E., Hines, S.A., Baszler, T.V., Katz, J.B., Hennager, S.G., Knowles, D.P., 1999. Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 37, 2285-2290.
- Machado, R.Z., Montassier, H.J., Pinto, A.A., Lemos, E.G., Machado, M.R., Valadao, I.F., Barci, L.G., Malheiros, E.B., 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet Parasitol* 71, 17-26.
- Malandrin, L., L'Hostis, M., Chauvin, A., 2004. Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using in vitro culture. *Vet Res* 35, 131-139.
- McElwain, T.F., Perryman, L.E., Musoke, A.J., McGuire, T.C., 1991. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 47, 213-222.
- Montero, E., Rodriguez, M., Oksov, Y., Lobo, C.A., 2009. *Babesia divergens* apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell. *Infect Immun* 77, 4783-4793.
- Mosqueda, J., McElwain, T.F., Stiller, D., Palmer, G.H., 2002. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect Immun* 70, 1599-1603.
- Norimine J., Mosqueda J., Suarez C., Palmer G.H., McElwain T.F., Mbassa G., Brown W.C. 2003. Stimulation of T-Helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* Rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge. *Infect Immun* 71, 5021-5032.
- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L., Jarra, W., 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* 2, 1461-1477.
- Ruef, B.J., Tuo W.B., Rodriguez S.D., Roussel A.J., Chitko McKown C.G., Palmer G.H., McElwain T.F., Canals A., Zarlenga D.S., Gasbarre L.C., Brown W.C. 1997. Immunization with *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 induces a type 1 cytokine response. *J Interferon Cytok Res* 17, 45-54.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Skuce, P.J., Mallon, T.R., Taylor, S.M., 1996. Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*. *Mol Biochem Parasitol* 77, 99-102.

- Suarez, C.E., McElwain, T.F., Stephens, E.B., Mishra, V.S., Palmer, G.H., 1991. Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol* 49, 329-332.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Hotzel, I., McElwain, T.F., 1998. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. *Mol Biochem Parasitol* 93, 215-224.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Hotzel, I., McElwain, T.F., 2003. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. *Mol Biochem Parasitol* 127, 101-112.
- Sun, Y., Moreau, E., Chauvin, A., Malandrin, L., submitted. New cellular and molecular insights into the process of *Babesia divergens* invasion of bovine erythrocytes.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Terkawi, M.A., Amornthep, A., Ooka, H., Aboge, G., Jia, H., Goo, Y.K., Nelson, B., Yamagishi, J., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Kawazu, S.I., Fujisaki, K., Xuan, X., 2009. Molecular characterizations of three distinct *Babesia gibsoni* rhoptry-associated protein-1s (RAP-1s). *Parasitology* 136, 1147-1160.
- Tessier, D., Yclon, P., Jacquemin, I., Larre, C., Rogniaux, H., 2010. OVNIp: an open source application facilitating the interpretation, the validation and the edition of proteomics data generated by MS analyses and de novo sequencing. *Proteomics* 10, 1794-1801.
- Vichido, R., Falcon, A., Ramos, J.A., Alvarez, A., Figueroa, J.V., Norimine, J., Brown, W.C., Castro, L.A., Mosqueda, J., 2008. Expression analysis of heat shock protein 20 and rhoptry-associated protein 1a in sexual stages and kinetes of *Babesia bigemina*. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 136-140.
- Wright, I.G., Casu, R., Commins, M.A., Dalrymple, B.P., Gale, K.R., Goodger, B.V., Riddles, P.W., Waltisbuhl, D.J., Abetz, I., Berrie, D.A., et al., 1992. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet Parasitol* 44, 3-13.
- Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C., Igarashi, I., 2002. Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. *Infect Immun* 70, 5822-5826.
- Yokoyama, N., Okamura, M., Igarashi, I., 2006. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet Parasitol* 138, 22-32.
- Zhou, J., Jia, H., Nishikawa, Y., Fujisaki, K., Xuan, X., 2007. *Babesia gibsoni* rhoptry-associated protein 1 and its potential use as a diagnostic antigen. *Vet Parasitol* 145, 16-20.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., Gray, J.S., 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev* 16, 622-636.
- Zuckerkindl, E., Pauling, L., 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving Genes and Proteins Academic Press, New York*, 97-166.

Discussion générale

La discussion qui va suivre n'a pas pour objectif de reprendre les points qui sont déjà discutés dans chaque article, mais plutôt de discuter des résultats dans leur globalité en faisant des liens entre eux, et de replacer et discuter les résultats obtenus dans le contexte plus général de la thèse et d'objectifs à plus long terme sur leur apport pour l'étude de la spécificité d'hôtes.

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée au processus d'invasion des érythrocytes par *B. divergens* et aux molécules impliquées dans ce processus. L'objectif à long terme dans lequel s'inscrit ce travail, et dont il constitue les tout premiers pas, porte sur la compréhension des mécanismes cellulaires puis moléculaires expliquant à la spécificité d'hôtes chez ce parasite, et donc sur l'étude de la barrière de spécificité. Les premiers travaux menés en ce sens ont porté sur le modèle *B. divergens* – mouton. Le modèle d'infection expérimentale « mouton » a été développé dans l'équipe ITPH en complément du modèle expérimental classique constitué par la gerbille de Mongolie (Lewis and Williams, 1979). L'objectif poursuivi était alors la mise en place d'un modèle expérimental d'infection permettant d'étudier la phase de portage asymptomatique de *B. divergens*, caractéristique des *Babesia*, que le modèle gerbille ne permet pas de reproduire, celle-ci développant une immunité stérilisante (Liddel et al., 1980). Après une première phase montrant la possibilité d'infecter des moutons splénectomisés avec *B. divergens* (Chauvin et al., 2002), l'équipe a approfondi l'étude en reproduisant chez le mouton non splénectomisé des infections asymptomatiques avec un portage de longue durée (Malandrin et al., 2009). L'aspect qui nous concerne le plus dans ces travaux est la mise en évidence chez le mouton d'individus sensibles et d'individus non sensibles à l'infection par *B. divergens*. Cette sensibilité in vivo de l'animal à l'infection s'explique au niveau cellulaire par la réussite ou l'échec du processus d'invasion des érythrocytes par *B. divergens* étudié in vitro. De ces travaux, il est donc ressorti qu'il était possible d'étudier in vitro les mécanismes de sensibilité des érythrocytes à ce parasite et surtout que le résultat des interactions in vitro préfigurait celui de l'infection in vivo (installation ou non du parasite) (Malandrin et al., 2009). L'application à l'étude de la spécificité d'hôtes semblait alors ouverte, en faisant varier l'espèce parasitaire ou l'espèce érythrocytaire, et en étudiant des mécanismes clés des interactions de ces parasites avec leur cellule hôte.

Dans l'étude des interactions *Babesia* – érythrocytes et dans l'objectif de l'étude des mécanismes de spécificité d'hôtes, faire varier l'espèce érythrocytaire (sensible ou non sensible que ce soit au sein d'une même espèce animale ou qu'il s'agisse d'espèces animales différentes) permet à priori de déterminer les facteurs de spécificité liés à la cellule hôte. Par contre, faire varier l'espèce parasitaire pour une même cellule cible permet à priori de s'adresser aux facteurs de spécificité liés au parasite.

Pour aborder la notion de spécificité d'hôtes en faisant varier l'espèce parasitaire, il fallait rechercher une espèce ayant une gamme d'hôtes chevauchante mais différente de celle de *B. divergens*. L'étude de *B. capreoli* semblait judicieuse. En effet, le choix d'une espèce décrite comme très proche (Enigk and Friedhoff, 1962a, b; Gray et al., 1990; Gray et al., 1991) présentait l'intérêt de pouvoir réaliser par la suite des comparaisons au niveau moléculaire d'orthologues potentiellement à la base de cette spécificité d'hôtes. Dans la première partie de mon travail, j'ai donc participé aux travaux ayant pour objectif de redéfinir taxonomiquement *B. capreoli* sur des bases moléculaires et phénotypiques, tout en précisant sa gamme d'hôtes, par les méthodes *in vitro* développées dans l'équipe (Article 1). Les résultats ont confirmé l'intérêt de cette espèce pour nos objectifs. *B. capreoli* est incapable de se développer *in vitro* en hématies de bovin, d'humain ou de mouton, contrairement à *B. divergens*, ce qui confirme *in vitro* une partie des résultats obtenus antérieurement par infections expérimentales (Enigk and Friedhoff, 1962a, b; Gray et al., 1990; Gray et al., 1991). En revanche, comme *B. divergens*, *B. capreoli* se développe *in vitro* en hématies de chevreuil ou de daim. Nous avons confirmé par séquençage de l'ADNr 18S la proximité phylogénétique de ces deux espèces, avec 99,83% d'homologie sur cette molécule. Ces deux espèces représentent donc un bon modèle comparatif pour l'étude de la spécificité d'hôtes. Leur degré élevé de parenté devrait permettre la réalisation d'études transcriptomiques ou protéomiques comparatives à différents stades du développement intra-érythrocytaire dans les cas sensibles et non sensibles.

Il est clair que les protéines spécifiques d'espèces parasitaires potentiellement responsables de la spécificité d'hôtes peuvent être celles impliquées dans l'adhésion puis l'invasion de la cellule cible, et dans la variation antigénique permettant l'évitement du système immunitaire de l'hôte (Liew et al., 2010). C'est non seulement la présence - absence de ces protéines mais aussi leur divergence entre les espèces qui pourraient entrer en jeu.

C'est pour cette raison qu'il apparaît essentiel dans l'analyse de ces protéines d'étudier leur variabilité génétique intra-spécifique afin de délimiter la part de divergence liée à l'espèce. Au début de mon travail de thèse, la seule protéine bien caractérisée ayant un rôle potentiel dans les interactions parasite-érythrocyte chez *B. divergens* était l'antigène de surface du mérozoite Bd37 (Delbecq et al., 2002) pour laquelle un polymorphisme génétique a été mis en évidence (Précigout et al., 2004; Hadj-Kaddour et al., 2007). Nous avons donc décidé de commencer par cette protéine pour les analyses moléculaires comparatives entre *B. divergens* et *B. capreoli* (Article 2).

Dans cette partie de mon travail de thèse, j'ai mis en évidence la présence d'un orthologue de *Bd37* chez *B. capreoli*, que nous avons appelé *Bcp37/41* en raison du polymorphisme de taille existant pour cette protéine entre plusieurs souches de *B. capreoli*. Chez cet orthologue, malgré un polymorphisme génétique encore plus élevé que celui de *Bd37*, sont conservées non seulement la structure générale du gène (ancres GPI, zones polymorphes, cystéines formant un pont disulfure ...), mais surtout les acides aminés supposés intervenir dans l'adhésion du parasite au globule rouge (Delbecq et al., 2008). Ces auteurs ont montré que cette protéine semblait permettre l'adhésion aux globules rouges par des interactions électrostatiques, sans qu'aucune spécificité ne soit démontrée. En effet, cette protéine adhère aussi bien aux globules rouges d'espèces non hôtes de *B. divergens* (chien) qu'aux espèces hôtes (bovin, humain) (Delbecq et al., 2008). La conservation chez *Bcp37/41* du site potentiellement impliqué dans l'adhésion semble confirmer la non spécificité du rôle de cet antigène de surface dans cette étape.

Si la phase d'adhésion du parasite au globule rouge ne semble pas être l'étape critique à laquelle se décide la spécificité de cellule cible, il est important de déterminer le(s) stade(s) ultérieur(s) des interactions parasite-érythrocyte au(x)quel(s) se situe(nt) la barrière de spécificité. Dans le cas des hémoparasites, il peut s'agir des étapes de pénétration du parasite dans l'hématie, de son développement dans l'hématie ou de sa sortie. Plus spécifiquement pour le genre *Babesia*, la capacité du parasite à détruire la vacuole parasitophore qui l'entoure et qui est constituée au départ essentiellement de la membrane du globule rouge pourrait représenter une étape clé. L'impossibilité de réaliser une telle étape pourrait bloquer le

développement ultérieur du parasite en empêchant les échanges trophiques de se produire normalement, aboutissant à la mort du parasite intra-érythrocytaire.

Le troisième objectif de ma thèse a donc été de mettre en place un test d'invasion, c'est à dire d'obtenir des parasites extra-érythrocytaires pour les mettre en contact avec des globules rouges sains afin de suivre le processus d'invasion et les étapes ultérieures de développement parasitaire (Article 3). Pour cela, de nombreuses mises au point méthodologiques ont été réalisées afin de définir le mode de préparation des parasites et le milieu d'incubation adéquat. L'objectif poursuivi était d'obtenir une culture après invasion ayant non seulement une parasitémie suffisante, mais également synchronisée, c'est-à-dire présentant des parasites tous au même stade de développement. Ces deux critères sont importants pour des analyses transcriptomiques et protéomiques ultérieures à des stades précis du développement parasitaire. Lors de la réalisation de ce travail, j'ai pu apporter ou confirmer, dans le cas d'hématies bovines, des données qualitatives sur le processus d'invasion des érythrocytes par *B. divergens*, telles que la rapidité du processus (moins d'une minute) ou la possibilité pour deux mérozoïtes de pénétrer en même temps dans un même globule rouge. Les seules données pour ce parasite proviennent d'une analyse par microscopie électronique du processus d'invasion de globules rouges humains par *B. divergens* (Montero et al., 2009). D'autres travaux sur *B. bovis* n'avaient pas pour objectif d'aller aussi finement dans la démonstration de la rapidité de ce processus (Franssen et al., 2003). Les données vont toutes dans le même sens : *B. divergens*, comme les autres membres des hémoprotozoaires tels que ceux du genre *Plasmodium*, a mis en place une machinerie permettant d'envahir sa cellule hôte très rapidement (Franssen et al., 2003; Montero et al., 2009; Boyle et al., 2010). Pour ces parasites, il en va de leur survie chez l'hôte vertébré. En effet, le stade mérozoïte libre est un stade très vulnérable car il est le seul stade accessible à la réponse immunitaire humorale de l'hôte, permettant non pas l'élimination du parasite mais un contrôle de la parasitémie (Brown, 2001). Une fois entré dans l'hématie, le parasite est à l'abri de l'action des anticorps.

Dans le protocole d'invasion mis au point, nous avons éliminé par gradient de Percoll les parasites demeurés libres dans le milieu. Cette étape permet une meilleure quantification des parasites après invasion et devrait permettre une comparaison quantitative de l'efficacité

des premières étapes d'invasion dans nos études ultérieures sur la spécificité d'hôte, en conditions compatibles (interaction réussie) et incompatibles (échec de l'interaction). Cette étape de séparation permet aussi de réduire la fenêtre de temps laissée au parasite pour pénétrer dans l'hématie afin d'obtenir un début de culture aussi synchronisé que possible. Malgré ces précautions, la culture de *B. divergens* ne reste pas synchronisée même au cours de la première génération suivant l'invasion. Cette absence de synchronisation a déjà été observée chez *B. bovis* (Franssen et al., 2003). Dans notre étude, des écarts de plusieurs heures dans le développement du parasite peuvent être observés. Des parasites sous leur forme trophozoite sont encore présents alors que d'autres sont en fin de division cellulaire. Il est difficile d'expliquer de telles différences de durée dans la réalisation d'un cycle parasitaire. Nos travaux ayant été réalisés sur un clone biologique de la souche Rouen 87, on ne s'attend donc pas à une variation importante au sein de la population parasitaire. Une explication possible serait une variabilité liée à la cellule cible, l'érythrocyte. Un critère variable pour des hématies d'un même individu prélevées en même temps est leur âge. Les globules rouges sont produits chez le vertébré de façon constante et ont une durée de vie estimée à 3 mois environ. Dans un prélèvement à un temps t , la population érythrocytaire est donc composée de cellules plus ou moins jeunes. Le globule rouge est une cellule « finie », sans ADN et donc sans synthèse de novo. Il est probable que des hématies d'âges variables n'aient pas la même capacité à assurer le développement des parasites intra-érythrocytaires, par épuisement progressif du pool de nutriments présents au départ. Ainsi, il a été montré que *B. gibsoni* envahit et se multiplie préférentiellement dans les réticulocytes du fait de la présence d'une grande quantité notamment de glutamate, de glutathione et d'adenosine 5'-triphosphate (Murase et al, 1993, Yamasaki et al., 2000, Yamasaki et al, 2002). Dans notre étude, la variabilité de développement parasitaire observée pourrait venir alors de l'hétérogénéité de la population de globules rouges utilisés. Il serait intéressant de vérifier expérimentalement cette hypothèse, car si c'est le cas, l'obtention d'une culture synchronisée ne dépend plus seulement de la façon dont on synchronise le parasite.

Le dernier objectif de ma thèse était de caractériser de nouveaux gènes et protéines impliqués dans le processus d'invasion du globule rouge par *B. divergens* afin d'élargir les connaissances dans ce domaine. Pour cela, j'ai bénéficié de l'existence au laboratoire

d'anticorps monoclonaux produits puis sélectionnés sur la base de deux critères : leur marquage du pôle apical des parasites et leur capacité à inhiber la croissance de *B. divergens*. Ces deux critères sont en effet fortement indicateurs de l'implication des antigènes reconnus dans les interactions parasite – érythrocyte. La reconnaissance par l'un des anticorps de la protéine de surface des mérozoites Bd37, pour laquelle les recherches étaient bien avancées (Delbecq et al., 2002; Delbecq et al., 20008; Précigout et al., 2004; Haddj-Kadour et al., 2007 comme références principales) nous a conduit à ne pas poursuivre nos investigations dans cette voie. Par contre, j'ai poursuivi la caractérisation de la protéine de 47 kDa reconnue par trois autres anticorps monoclonaux, je l'ai identifié comme étant RAP-1 et confirmé sa localisation au niveau du bulbe des rhoptries par microscopie électronique (Article 4). Même si la culture ne reste pas complètement synchronisée après un test d'invasion, des transcrits de *rap-1* sont présents très rapidement au stade trophozoite après le début du développement intra-érythrocytaire de *B. divergens* avec une augmentation correspondant à l'apparition des premières formes parasitaires en début de division dans la culture. Une régulation transcriptionnelle de *rap-1* en relation avec le cycle de développement intra-érythrocytaire du parasite semble donc exister. Une augmentation significative de la quantité de RAP-1 a aussi été démontrée tout au long du cycle, ce qui indique son accumulation progressive dans les rhoptries en formation. La présence de RAP-1 au stade trophozoite juste après invasion est surprenante, même si cela semble être le cas dans le genre *Babesia* pour d'autres RAP-1 (Yokoyama et al., 2002; Terkawi et al., 2009). Cette protéine est supposée être sécrétée au cours du processus d'invasion et les organelles qui la contenaient détruits après invasion (Preiser et al., 2000). On peut donc se demander si la totalité de cette protéine a été sécrétée, et où RAP-1 est localisée au cours de cette période de reconstruction des organelles du complexe apical de chacune des cellules filles. Il n'existe pas à ma connaissance d'études détaillées sur le profil de transcription au cours du cycle parasitaire asexué de protéines de rhoptrie impliquées dans l'invasion chez *Babesia*. Ces études existent chez *Plasmodium* (Khan et al., 2001 pour Py235 ; Kaneko et al., 2005 pour les protéines RhopH1/Clag), mais la différence de durée du cycle et l'existence de stades intra-érythrocytaires différents chez *Plasmodium* (stade schizonte) rendent difficiles les comparaisons avec *Babesia*.

Pour les deux gènes caractérisés dans ma thèse, *Bcp37/41* et *Bdrap-1*, la variabilité génétique a été caractérisée. La forte variabilité génétique des gènes codant les protéines de surface des mérozoïtes des Apicomplexes est une de leur caractéristique (Rich et al., 2000; Carcy et al., 2006). Cette caractéristique est retrouvée chez *Bcp37/41* de *B. capreoli* avec un polymorphisme lié, dans la région N-terminale, à des délétions insertions responsables du polymorphisme de taille observé, et à des mutations ponctuelles dans le reste du gène. Le polymorphisme observé pour les 6 séquences de *Bcp37/41* obtenues lors de ma thèse semble plus élevé que celui connu pour son orthologue *Bd37* chez *B. divergens*. En effet, sur une portion de gène de longueur comparable entre ces deux orthologues (472 pb) et pour un nombre identique de séquences pour chaque espèce (6 séquences), 45 % seulement des nucléotides sont conservés chez *Bcp37/41* contre 66% pour *Bd37*. Cette très forte variabilité a été démontrée sur un nombre d'isolats de *B. capreoli* plus important (84 isolats) dans une étude menée au sein du laboratoire utilisant la technique de PCR-RFLP sur le gène *Bcp37/41* avec les amorces définies pour *Bd37* par Hadj-Kadour et al. en 2007 (Bastian et al., manuscrit en cours de révision). En effet, des profils de restriction identiques n'ont été obtenus que pour quelques isolats. Cette même technique utilisée pour *B. divergens* n'a permis d'identifier que 6 profils ou clades différents (Hadj-Kadour et al., 2007 et article 1 de mon étude), pour des isolats de la France entière et de l'Europe. Par contre, la forte variabilité de *Bcp37/41* a été observée pour des isolats provenant de deux régions géographiques limitées (réserves fermées de Chizé et de Trois-Fontaines) en France (Malandrin et al., 2010 ; Bastian et al., manuscrit en cours de révision). Dans ces deux réserves de faune sauvage, des taux d'infection très élevés des Cervidés par les hémoparasites ont été trouvés. Des séroprévalences de pratiquement 100% indiquent effectivement une très forte circulation de ces parasites. La confirmation de leur présence dans 42% des cas a été apportée par l'isolement de *Babesia* spp. in vitro (*B. capreoli* et *B. sp.* EU1), et ce malgré les difficultés à obtenir et maintenir *B. capreoli* en culture (Bastian et al., manuscrit en cours de révision). Une très forte pression immunitaire de la part d'hôtes réinfectés fréquemment et un « recyclage » parasitaire important (maintien sur un site clos des hôtes vertébrés mais aussi des vecteurs) pourraient certainement être à l'origine de l'important polymorphisme de ce gène codant pour un antigène de surface immunodominant. La comparaison du polymorphisme de ce gène entre

des isolats présents sur des Cervidés en milieu ouvert et ceux présents chez ces chevreuils de réserve pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

Une autre hypothèse serait une évolution différente du polymorphisme de ce gène selon les espèces de *Babesia*. Des études sur le polymorphisme du gène *mSP1* chez différentes espèces de *Plasmodium* infectant l'homme et les singes ont montré une sélection positive sur ce gène codant pour un antigène de surface cible du système immunitaire, variable en fonction des espèces parasitaires (Tanabe et al., 2007 ; Sawai et al., 2010). L'analyse de ces sélections positives chez différentes espèces proches phylogénétiquement en fonction de leur gamme d'hôtes pourrait aider à déterminer les éléments essentiels à leur adaptation à de nouveaux hôtes, et donc à la base de leur spécificité d'hôtes. Pour l'étude de ces aspects-là aussi, les deux espèces *B. divergens* et *B. capreoli*, représentent un modèle très intéressant d'analyse comparative.

Pour le deuxième gène caractérisé au cours de ma thèse, *Bdrap-1*, j'ai mis en évidence un très faible niveau de polymorphisme génétique, au moins parmi les souches de *B. divergens* isolées en France. La quasi absence de polymorphisme observée pour *Bdrap-1* s'apparente à ce qui a été mis en évidence pour les deux copies de *rap-1a* existant chez *B. bovis* (Suarez et al., 1998), et dont le rôle dans l'invasion est également démontré (Mosqueda et al., 2002 ; Yokoyama et al., 2002). Les pressions de sélection exercées sur ce gène chez *B. bovis* et *B. divergens*, notamment de la part du système immunitaire, semblent donc faibles. Pourtant, le rôle de BdRAP-1 dans l'invasion de l'érythrocyte est fortement suspecté (localisation dans les rhoptries) et sa sécrétion au moins partiellement dans le milieu extra-érythrocytaire est attestée par l'inhibition de croissance observée en utilisant les différents anticorps monoclonaux anti-BdRAP-1. Elle est donc bien dans ces conditions exposées au système immunitaire.

Tous les gènes *rap-1* connus ne sont pas aussi monorphes. Ainsi, chez *B. caballi*, les séquences de *rap-1* pour les souches originaires des Etats-Unis diffèrent nettement de celles d'Afrique du Sud, pour lesquelles deux sous-groupes peuvent encore être différenciés (Bhoora et al., 2010). Une distance géographique supérieure entre leurs isolats en comparaison de celle de nos isolats pourrait expliquer cette divergence plus importante de séquence. L'analyse d'un plus grand nombre d'isolats pourrait compléter notre étude.

Dans l'étude sur *B. caballi*, les regroupements des séquences *rap-1* sont en accord avec les clades définies sur la base des comparaisons du gène ADNr 18S (Bhoora et al., 2010). Cette tendance est également observée pour les espèces de *Babesia* si on compare les arbres phylogénétiques obtenus par analyse de l'ADNr 18S (Criado-Fornelio et al., 2003 – figure 6 p32) et celui obtenu pour *rap-1* (figure 4 de l'article 4, p144), même si certains nœuds ne sont pas supportés par des valeurs de bootstrap élevées pour *rap-1*. On retrouve les deux groupes définis sur la base de l'ADNr 18S, les Ungulibabesiidés d'une part (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi* et *B. ovis*) et les Babesiidés d'autre part (*B. canis*, *B. divergens* et *B. gibsoni*), même si la position de *B. divergens* reste à compléter. Seules les séquences de *B. bigemina rap-1b* et *rap-1c* diffèrent et ne rentrent dans aucune de ces deux clades. Cela souligne encore le caractère assez particulier de ces deux gènes, présents au sein d'un locus d'une rare complexité, transcrits mais non exprimés par le parasite (Suarez et al. 2003).

Conclusions et perspectives

Au cours de mon travail de thèse, j'ai donc emprunté des voies de recherche différentes, même si le thème de l'interaction *Babesia* - érythrocyte, et plus précisément les mécanismes de l'invasion de l'hématie et les molécules impliquées, est resté au centre de mes préoccupations.

Dans l'objectif à long terme d'étudier les bases de la spécificité d'hôte, le développement de modèles d'étude a été poursuivi. Pour cela, nous avons validé l'intérêt de l'étude comparative de deux espèces proches, *B. capreoli* et *B. divergens*. La très grande proximité phylogénétique de ces deux espèces, que nous avons mis en évidence, laissait supposer que les gènes présents chez une des deux espèces auraient leurs orthologues chez la deuxième espèce, et que l'absence ou la divergence génétique de ces orthologues pourraient être à la base de la spécificité. Nous avons pu vérifier la présence chez *B. capreoli* d'orthologues de gènes très variables chez *B. divergens*, dans le cas du gène codant la protéine de surface majoritaire du mérozoite chez *B. divergens*, Bd37. Ces gènes, soumis à une très forte pression immunitaire, sont en effet parmi les plus variables chez les Apicomplexes. Pour Bcp37/41, malgré un fort polymorphisme, la conservation des sites impliqués chez *B. divergens* dans l'adhésion aux globules rouges, a confirmé le caractère non spécifique de cette protéine dans les interactions avec l'érythrocyte.

Ce polymorphisme génétique important de Bcp37/41 a été observé pour des isolats provenant de régions géographiques pourtant limitées. Une des hypothèses avancée pour expliquer ce fort niveau de polymorphisme, supérieur à celui de son orthologue Bd37, est l'intensité de la pression immunitaire sélective exercée sur les parasites étudiés. En effet, chez des animaux présentant un fort taux d'infection et vivant en milieu fermé comme c'est le cas dans ces réserves de faune sauvage, le risque pour un parasite d'infecter un hôte déjà immunisé contre lui est élevé, ce qui augmente les chances de sélectionner un variant pour une protéine immunodominante telle que celle présente en surface du mérozoite. Pour vérifier cette hypothèse, nous nous proposons d'analyser le polymorphisme de ce gène chez des parasites isolés à partir de chevreuils en liberté. L'accès à de tels prélèvements est difficile, sauf pour des animaux chassés et donc mort, chez qui le sang est délicat à prélever du fait de

sa coagulation. Le laboratoire a donc mis au point l'isolement de ces parasites à partir de la rate, organe filtrant le sang et connu pour être enrichi en hématies parasitées.

La poursuite de l'analyse comparative de ces 2 espèces peut être envisagée de plusieurs façons. Tout d'abord, nous pourrions caractériser chez *B. capreoli* d'autres gènes impliqués dans les interactions avec l'érythrocyte, et analyser leur polymorphisme afin de déterminer d'éventuelles divergences espèce-spécifique qui pourraient être à la base de la spécificité d'hôtes. Les cibles visées dans un premier temps sont AMA-1 et BdSUB caractérisées récemment chez *B. divergens* (Montero et al., 2006; Montero et al., 2009). La recherche d'autres molécules parasitaires que celles impliquées dans l'invasion de l'érythrocyte peut être également entreprise. Pour cela, une analyse transcriptomique et/ou protéomique à différentes étapes du cycle de développement parasitaire pourra être engagée à titre comparatif entre les conditions sensibles (*B. divergens* – érythrocyte bovin ou humain) et non sensibles (*B. capreoli* – érythrocyte bovin ou humain). Cette étude devra être menée sur une culture synchronisée (au moins partiellement telle que mise au point dans mon travail) afin de cibler différentes étapes clés du cycle. L'étape à laquelle se situe le blocage du cycle parasitaire dans le globule devra au préalable être définie. Pour cela, des colorations type dead-alive, des indicateurs métaboliques, des analyses de réplication de l'ADN par cytométrie de flux, ou des marqueurs d'apoptose seront nécessaires. Ce type d'analyse comparative pourra aussi être mené dans le cas des interactions *B. divergens* – érythrocytes de mouton sensibles et non sensibles, afin de déterminer si l'étape du blocage liée cette fois-ci plus probablement à l'érythrocyte est la même que dans le cas d'une incompatibilité liée au parasite. Des analyses protéomiques comparatives de ces érythrocytes (sensibles et non sensibles) peuvent être engagées en parallèle.

Pour ces travaux, des méthodes pour améliorer la synchronisation de la culture de *B. divergens* pourront être recherchées, en utilisant par exemple des inhibiteurs chimiques de certaines étapes du cycle cellulaire (réplication de l'ADN, division cellulaire) à mode d'action réversible. Une augmentation de l'homogénéité de la population érythrocytaire pourrait être améliorée la synchronisation des parasites intra-érythrocytaires. Pour cela, une

stimulation de l'érythropoïèse avant le prélèvement de sang nécessaire à la culture peut permettre d'enrichir la population érythrocytaire en réticulocytes puis en érythrocytes jeunes, et donc d'obtenir des érythrocytes ayant une fenêtre d'âge plus réduite. L'influence de cette homogénéisation sur l'amélioration de la synchronisation pourra ainsi être analysée.

Comme j'ai pu le montrer dans mon travail, le locus *rap* comporte au moins 4 gènes différents, dont celui que j'ai caractérisé. L'organisation du locus dans son entier, l'analyse de l'expression des autres gènes et la localisation des autres protéines Rap pourraient être entreprises afin de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans l'invasion, et la raison de la multiplicité de ces gènes chez un même individu, caractéristique constante dans cette famille.

Enfin, afin de valoriser mon travail sur les séquences que j'ai produites, une PCR nichée sur les gènes *Bd37* et *Bcp37/41*, spécifique de chacune des deux espèces est en cours de développement et sera utilisée pour des études épidémiologiques de ces deux agents pathogènes transmis par les tiques.

La poursuite des travaux sur les interactions *B. divergens* – érythrocyte présente un intérêt fondamental évident et de nombreux moyens de contrôle de ce parasite découlent des connaissances acquises. La comparaison des mécanismes fondamentaux de ces processus avec ceux connus chez *Plasmodium* représente également une source d'informations utiles à leur compréhension chez les deux parasites. Un processus fondamental et différent entre ces deux parasites intra-érythrocytaires est la persistance ou non de la vacuole parasitophore suite à l'invasion parasitaire, et dont le devenir va influencer de façon essentielle les échanges du parasite non seulement avec le globule rouge mais aussi avec le milieu extérieur, échanges nutritionnels essentiels à sa survie. La réussite ou non du développement de *Babesia* dans l'érythrocyte pourrait en partie dépendre de la réalisation de cette étape de destruction de la vacuole parasitophore qui mériterait de plus amples travaux de recherche.

Les connaissances sur les interactions *Babesia*-érythrocyte sont limitées et *B. divergens* représente un bon modèle d'étude de ces aspects, comme représentant du genre, à de fins comparatives sur des mécanismes biologiques différents entre les 3 genres principaux infectant les érythrocytes (*Babesia*, *Theileria* et *Plasmodium*). De part sa gamme d'hôtes naturels et expérimentaux, les questions sur les mécanismes de spécificité d'hôtes peuvent être abordés selon différents angles, avec un parallèle possible avec l'espèce *B. capreoli* de gamme d'hôtes à notre connaissance plus restreinte.

Références bibliographiques

- Ahmed, J.S., Luo, J., Schnittger, L., Seitzer, U., Jongejan, F., Yin, H., 2006. Phylogenetic position of small-ruminant infecting piroplasms. *Ann N Y Acad Sci* 1081, 498-504.
- Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., De Waal, D.T., Allsopp, B.A., 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology* 108 (Pt 2), 147-152.
- Allsopp, M.T., Allsopp, B.A., 2006. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Ann N Y Acad Sci* 1081, 509-517.
- Almeria, S., Castella, J., Ferrer, D., Ortuno, A., Estrada-Pena, A., Gutierrez, J.F., 2001a. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet Parasitol* 99, 249-259.
- Almeria, S., Castella, J., Ferrer, D., Sparagano, Estrada-Pena, A., 2001b. First report of *Babesia bovis* in Spain. *Vet Rec* 149, 716-717.
- Altay, K., Dumanli, N., Aktas, M., 2007. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Vet Parasitol* 147, 161-165.
- Anders, R.F., Crewther, P.E., Edwards, S., Margetts, M., Matthew, M.L., Pollock, B., Pye, D., 1998. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 16, 240-247.
- Bannister, L., Mitchell, G., 2003. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol* 19, 209-213.
- Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S., Mitchell, G.H., 2000. Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. *Parasitology* 121 (Pt 3), 273-287.
- Bastian, S., Jouglin M., Brisseau N., Malandrin L., Klegou G., L'Hostis M., Chauvin A., Cervids as a reservoir for zoonotic Babesia species in Europe : tools for identification, epidemiology and disease ecology studies. *J Wildlife Dis.* Manuscrit en cours de révision
- Barrett, A.J., McDonald, J.K., 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J* 237, 935.
- Beckers, C.J., Dubremetz, J.F., Mercereau-Puijalon, O., Joiner, K.A., 1994. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* 127, 947-961.

- Berens, S.J., Brayton, K.A., Molloy, J.B., Bock, R.E., Lew, A.E., McElwain, T.F., 2005. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. *Infect Immun* 73, 7180-7189.
- Bhoora, R., Quan, M., Zweygarth, E., Guthrie, A.J., Prinsloo, S.A., Collins, N.E., 2010. Sequence heterogeneity in the gene encoding the rhoptry-associated protein-1 (RAP-1) of *Babesia caballi* isolates from South Africa. *Vet Parasitol* 169, 279-288.
- Blackman, M.J., Fujioka, H., Stafford, W.H., Sajid, M., Clough, B., Fleck, S.L., Aikawa, M., Grainger, M., Hackett, F., 1998. A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J Biol Chem* 273, 23398-23409.
- Blackman, M.J., Bannister, L.H., 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* 117, 11-25.
- Bonnet, S., Jouglin, M., L'Hostis, M., Chauvin, A., 2007. *Babesia sp.* EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* 13, 1208-1210.
- Boyle, M.J., Wilson, D.W., Richards, J.S., Riglar, D.T., Tetteh, K.K.A., Conway, D.J., Ralph, S.A., Baum, J., Beeson, J.G., 2010. Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 107, 14378-14383.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Ruef, B.J., Suarez, C.E., Shkap, V., Chitko-McKown, C.G., Tuo, W., Rice-Ficht, A.C., Palmer, G.H., 1996. *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains. *Infect Immun* 64, 3341-3350.
- Brown, W.C., 2001. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet parasitol* 101, 233-248.
- Cancrini, G., Gabrielli, S., Lori, A., Grifoni, G., Calderini, P., 2008. Morphology and genetics of a *Babesia* isolate from *Capreolus capreolus*. *J Wildl Dis* 44, 168-171.
- Cantu, A., Ortega, S.J., Mosqueda, J., Garcia-Vazquez, Z., Henke, S.E., George, J.E., 2007. Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northern Mexico. *J Wildl Dis* 43, 504-507.

- Carcy, B., Precigout, E., Valentin, A., Gorenflot, A., Schrevel, J., 1995. A 37-kilodalton glycoprotein of *Babesia divergens* is a major component of a protective fraction containing low-molecular-mass culture-derived exoantigens. *Infect Immun* 63, 811-817.
- Carcy, B., Precigout, E., Schetters, T., Gorenflot, A., 2005. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet Parasitol* 138, 33-49.
- Carcy, B., Précigout, E., Schetters, T., Gorenflot, A., 2006. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet Parasitol* 31, 33-49.
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D., 1997. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 73, 114-123.
- Carruthers, V.B., Giddings, O.K., Sibley, L.D., 1999. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol* 1, 225-235.
- Chauvin, A., L'Hostis, M., Valentin, A., Precigout, E., Cesbron-Zeggane, N., Gorenflot, A., 1995. *Babesia divergens*: an ELISA with soluble parasite antigen for monitoring the epidemiology of bovine babesiosis. *Parasite* 2, 257-262.
- Chauvin, A., Valentin, A., Malandrin, L., L'Hostis, M., 2002. Sheep as a new experimental host for *Babesia divergens*. *Vet Res* 33, 429-433.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L., 2009. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res* 40, 37.
- Chesne-Seck, M.L., Pizarro, J.C., Vulliez-Le Normand, B., Collins, C.R., Blackman, M.J., Faber, B.W., Remarque, E.J., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Bentley, G.A., 2005. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. *Mol Biochem Parasitol* 144, 55-67.
- Christensson, D.A., 1989. Inverse age resistance to experimental *Babesia divergens* infection in cattle. *Acta Vet Scand* 30, 453-464.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet Parasitol* 114, 173-194.

- Dalrymple, B.P., 1993. Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. *Acta Trop* 53, 227-238.
- Dalrymple, B.P., Casu, R.E., Peters, J.M., Dimmock, C.M., Gale, K.R., Boese, R., Wright, I.G., 1993. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. *Mol Biochem Parasitol* 57, 181-192.
- Dalrymple, B.P., Peters, J.M., Bose, R., Wright, I.G., 1996. A polymerase chain reaction method for the identification of genes encoding members of the Bv60/p58 family of rhoptry protein homologues in the genus *Babesia*. *Exp Parasitol* 84, 96-100.
- Delbecq, S., Precigout, E., Vallet, A., Carcy, B., Schetters, T.P., Gorenflot, A., 2002. *Babesia divergens*: cloning and biochemical characterization of Bd37. *Parasitology* 125, 305-312.
- Delbecq, S., Precigout, E., Schetters, T., Gorenflot, A., 2003. *Babesia divergens*: cloning of a Ran binding protein 1 homologue. *Vet Parasitol* 115, 205-211.
- Delbecq, S., Hadj-Kaddour, K., Randazzo, S., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., Precigout, E., 2006. Hydrophobic moieties in recombinant proteins are crucial to generate efficient saponin-based vaccine against Apicomplexan *Babesia divergens*. *Vaccine* 24, 613-621.
- Delbecq, S., Auguin, D., Yang, Y.S., Lohr, F., Arold, S., Schetters, T., Precigout, E., Gorenflot, A., Roumestand, C., 2008. The solution structure of the adhesion protein Bd37 from *Babesia divergens* reveals structural homology with eukaryotic proteins involved in membrane trafficking. *J Mol Biol* 375, 409-424.
- DeSimone, T.M., Bei, A.K., Jennings, C.V., Duraisingh, M.T., 2009. Genetic analysis of the cytoplasmic domain of the PfRh2b merozoite invasion protein of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 39, 399-405.
- Devos, J., Geysen, D., 2004. Epidemiological study of the prevalence of *Babesia divergens* in a veterinary practice in the mid-east of France. *Vet Parasitol* 125, 237-249.
- Dowling, S.C., Perryman, L.E., Jasmer, D.P., 1996. A *Babesia bovis* 225-kilodalton spherical-body protein: localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after merozoite invasion. *Infect Immun* 64, 2618-2626.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N., 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* 28, 1007-1013.

- Duh, D., Petrovec, M., Bidovec, A., Avsic-Zupanc, T., 2005. Cervids as *Babesiae* hosts, Slovenia. *Emerg Infect Dis* 11, 1121-1123.
- Enigk, K., Friedhoff, K., 1962a. [On the host specificity of *Babesia divergens* (*Piroplasmidea*).]. *Z Parasitenkd* 21, 238-256.
- Enigk, K., Friedhoff, K., 1962b. [*Babesia capreoli* n. sp. in the deer (*Capreolus capreolus* L.)]. *Z Tropenmed Parasitol* 13, 8-20.
- Fang, X.D., Kaslow, D.C., Adams, J.H., Miller, L.H., 1991. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol* 44, 125-132.
- Figueroa, J.V., Buening, G.M., Kinden, D.A., 1990. Purification of the erythrocytic stages of *Babesia bigemina* from cultures. *Parasitol Res* 76, 675-680.
- Fisher, T.G., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 2001. Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American isolates of *Babesia bigemina*. *Infect Immun* 69, 3782-3790.
- Florin-Christensen, M., Suarez, C.E., Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T.F., 2002. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infect Immun* 70, 3566-3575.
- Franssen, F.F., Gaffar, F.R., Yatsuda, A.P., de Vries, E., 2003. Characterisation of erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites efficiently released from their host cell after high-voltage pulsing. *Microbes Infect* 5, 365-372.
- Friedhoff, K.T., 1981. Morphologic aspects of *Babesia* in the tick. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds.). *Babesiosis*. Academic Press, New York, USA, 143-169.
- Gaffar, F.R., Yatsuda, A.P., Franssen, F.F., de Vries, E., 2004. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 72, 2947-2955.
- Galinski, M.R., Xu, M., Barnwell, J.W., 2000. *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein-2 (PvRBP-2) shares structural features with PvRBP-1 and the *Plasmodium yoelii* 235 kDa rhoptry protein family. *Mol Biochem Parasitol* 108, 257-262.
- Garnham, P.C., 1959. [Research on the exo-erythrocyte cycle in malaria in mammals.]. *Rend Ist Sup Sanit* 22, 1189-1199.

- Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F., Sparagano, O., 2001. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol* 99, 273-286.
- Goff, W.L., Davis, W.C., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Johnson, W.C., Bailey, J.F., McGuire, T.C., 1988. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infect Immun* 56, 2363-2368.
- Gohil, S., Kats, L.M., Sturm, A., Cooke, B.M., 2010. Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: moovin' forward. *Trends Parasitol* 26, 591-599.
- Gorenflot, A., Precigout, E., Bissuel, G., Lecointre, O., Brasseur, P., Vidor, E., L'Hostis, M., Schrevel, J., 1990. Identification of major *Babesia divergens* polypeptides that induce protection against homologous challenge in gerbils. *Infect Immun* 58, 4076-4082.
- Gorenflot A., Moubri K., Precigout E., Carcy B., Schetters T.P., 1998. Human babesiosis. *Ann Trop Med Parasitol* 92, 489-501.
- Gorenflot, A., Brasseur, P., Precigout, E., L'Hostis, M., Marchand, A., Schrevel, J., 1991. Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: ox, gerbil, man. *Parasitol Res* 77, 3-12.
- Gowda, D.C., Gupta, P., Davidson, E.A., 1997. Glycosylphosphatidylinositol anchors represent the major carbohydrate modification in proteins of intraerythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 272, 6428-6439.
- Grande, N., Precigout, E., Camillieri, S., Carcy, B., Moubri, K., Gorenflot, A., 1998. Comparison between asexual and sexual culture-derived antigens of *Babesia divergens* in their ability to induce immunoprotection in gerbils. *Parasitol. Int.* 47, 269-279.
- Gray, J.S., 1980. Studies on the activity of *Ixodes ricinus* in relation to the epidemiology of babesiosis in Co. Meath, Ireland. *Br Vet J* 136, 427-436.
- Gray, J.S., Murphy, T.M., Taylor, S.M., Blewett, D.A., Harrington, R., 1990. Comparative morphological and cross transmission studies with bovine and deer *Babesias* in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 9, 185-193.
- Gray, J.S., Murphy, T.M., Waldrup, K.A., Wagner, G.G., Blewett, D.A., Harrington, R., 1991. Comparative studies of *Babesia spp.* from white-tailed and sika deer. *J Wildl Dis* 27, 86-91.

- Gray, J.S., 2006. Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40, 131-136.
- Gray, J., Kaye, B. EUCALB,
http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php?option=com_content&task=view&id=53&Itemid=84, site consulté le 9 septembre 2010
- Hadj-Kaddour, K., Carcy, B., Vallet, A., Randazzo, S., Delbecq, S., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., Precigout, E., 2007. Recombinant protein Bd37 protected gerbils against heterologous challenges with isolates of *Babesia divergens* polymorphic for the bd37 gene. *Parasitology* 134, 187-196.
- Harris, P.K., Yeoh, S., Dluzewski, A.R., O'Donnell, R.A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L.H., Mitchell, G.H., Blackman, M.J., 2005. Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog* 1, 241-251.
- Haselbarth, K., Tenter, A.M., Brade, V., Krieger, G., Hunfeld, K.P., 2007. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol* 297, 197-204.
- Healer, J., Triglia, T., Hodder, A.N., Germmill, A.W., Cowman, A.F., 2005. Functional analysis of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 utilizing interspecies domains. *Infect Immun* 73, 2444-2451.
- Hentrich, B., Böse, R., 1993. Cryopreservation of *Babesia divergens* from jirds as live vaccine for cattle. *Int J Parasitol* 23, 771-776.
- Herwaldt, B., Persing, D.H., Precigout, E.A., Goff, W.L., Mathiesen, D.A., Taylor, P.W., Eberhard, M.L., Gorenflot, A.F., 1996. A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans. *Ann Intern Med* 124, 643-650.
- Herwaldt, B.L., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 9, 942-948.
- Hilpertshauer, H., Deplazes, P., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mathis, A., 2007. Genotyping of *Babesia bigemina* from cattle from a non-endemic area (Switzerland). *Vet Parasitol* 145, 59-64.

- Hines, S.A., McElwain, T.F., Buening, G.M., Palmer, G.H., 1989. Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. *Mol Biochem Parasitol* 37, 1-9.
- Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., McGuire, T.C., McElwain, T.F., 1992. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. *Mol Biochem Parasitol* 55, 85-94.
- Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T.F., Suarez, C.E., Vidotto, O., Rice-Ficht, A.C., 1995a. Genetic and antigenic characterization of *Babesia bovis* merozoite spherical body protein Bb-1. *Mol Biochem Parasitol* 69, 149-159.
- Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Goff, W.L., McElwain, T.F., 1995b. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infect Immun* 63, 349-352.
- Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gonczi, E., Deplazes, P., Braun, U., Engels, M., Schupbach, J., Jorger, K., Thoma, R., Griot, C., Stark, K.D., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K.M., Lutz, H., 2004. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol* 42, 3775-3780.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., 3rd, Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* 13, 451-469.
- Hotzel, I., Suarez, C.E., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 1997. Genetic variation in the dimorphic regions of RAP-1 genes and rap-1 loci of *Babesia bigemina*. *Mol Biochem Parasitol* 90, 479-489.
- Howard, R.F., Narum, D.L., Blackman, M., Thurman, J., 1998. Analysis of the processing of *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated protein 1 and localization of Pr86 to schizont rhoptries and p67 to free merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 92, 111-122.
- Howell, S.A., Withers-Martinez, C., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Blackman, M.J., 2001. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* 276, 31311-31320.
- Howell, S.A., Well, I., Fleck, S.L., Kettleborough, C., Collins, C.R., Blackman, M.J., 2003. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. *J Biol Chem* 278, 23890-23898.
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A., Gray, J.S., 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol* 38, 1219-1237.

- Jasmer, D.P., Reduker, D.W., Hines, S.A., Perryman, L.E., McGuire, T.C., 1992a. Surface epitope localization and gene structure of a *Babesia bovis* 44-kilodalton variable merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol* 55, 75-83.
- Jasmer, D.P., Reduker, D.W., Perryman, L.E., McGuire, T.C., 1992b. A *Babesia bovis* 225-kilodalton protein located on the cytoplasmic side of the erythrocyte membrane has sequence similarity with a region of glycogen phosphorylase. *Mol Biochem Parasitol* 52, 263-269.
- Joyner, L.P., Donnelly, J., 1979. The epidemiology of babesial infections. *Avances in Parasitology* 17, 115-140.
- Kaneko, O., Lim, B.Y.S.Y., Iriko, H., Ling, I.T., Otsuki, H., Grainger, M., Tsuboi, T., Adams, J.H., Mattei, D., Holder, A.A., Torii, M., Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. *Mol Biochem Parasitol* 143, 20-28.
- Kats, L.M., Cooke, B.M., Coppel, R.L., Black, C.G., 2008. Protein trafficking to apical organelles of malaria parasites - building an invasion machine. *Traffic* 9, 176-186.
- Khan, S.M., Jarra, W., Preiser, P.R., The 235 kDa rhoptry protein of *Plasmodium (yoelii) yoelii*: function at the junction. *Mol Biochem Parasitol* 117, 1-10.
- Kocken, C.H., Dubbeld, M.A., Van Der Wel, A., Pronk, J.T., Waters, A.P., Langermans, J.A., Thomas, A.W., 1999. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect Immun* 67, 43-49.
- Kocken, C.H., Narum, D.L., Massougbojji, A., Ayivi, B., Dubbeld, M.A., van der Wel, A., Conway, D.J., Sanni, A., Thomas, A.W., 2000. Molecular characterisation of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. *Mol Biochem Parasitol* 109, 147-156.
- Koussis, K., Withers-Martinez, C., Yeoh, S., Child, M., Hackett, F., Knuepfer, E., Juliano, L., Woehlbier, U., Bujard, H., Blackman, M.J., 2009. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *EMBO J* 28, 725-735.
- Kuttler, K.L., Clifford, D.J., Touray, B.N., 1988. Prevalence of anaplasmosis and babesiosis in N'Dama cattle of the Gambia. *Trop Anim Health Prod* 20, 37-41.
- L'Hostis, M., 1995. Epidemiology and vaccination strategy: *Babesia divergens* bovine babesiosis example. *Vet Res* 26, 240-243.

- L'Hostis, M., Chauvin, A., Valentin, A., Marchand, A., Gorenflot, A., 1995. Large scale survey of bovine babesiosis due to *Babesia divergens* in France. *Vet Rec* 136, 36-38.
- L'Hostis, M., Chauvin, A., 1999. *Babesia divergens* in France: descriptive and analytical epidemiology. *Parassitologia* 41 Suppl 1, 59-62.
- Langton, C., Gray, J.S., Waters, P.F., Holman, P.J., 2003. Naturally acquired babesiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) herd in Great Britain. *Parasitol Res* 89, 194-198.
- Lehtinen, L.E., Birkenheuer, A.J., Droleskey, R.E., Holman, P.J., 2008. In vitro cultivation of a newly recognized *Babesia sp.* in dogs in North Carolina. *Vet Parasitol* 151, 150-157.
- LeRoith, T., Berens, S.J., Brayton, K.A., Hines, S.A., Brown, W.C., Norimine, J., McElwain, T.F., 2006. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 hypervariable region induces surface-reactive antibodies that block merozoite invasion. *Infect Immun* 74, 3663-3667.
- Levine, N.D., Campbell, G.R., 1971. A check-list of the species of the genus *Haemoproteus* (Apicomplexa, Plasmodiidae). *J Protozool* 18, 475-484.
- Levine, N.D., Ivens, V., 1988. Cross-transmission of *Eimeria spp.* (Protozoa, Apicomplexa) of rodents--a review. *J Protozool* 35, 434-437.
- Lewis, D., Williams, H., 1979. Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*. *Nature* 278, 170-171.
- Liddell, K.G.; Lucas, S.B., Williams, H., 1981. *Babesia divergens* infections in the Mongolian gerbil - Characteristics of a human strain. *Parasitology* 82, 205-224.
- Liew, K.J.L., Hu, G.G., Bozdech, Z., Peter, P.R. 2010. Defining species specific genome differences in malaria parasites. *BMC Genomics* 11, 23 February 2010
- Lingelbach, K., Joiner, K.A., 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 11), 1467-1475.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* 15, 155-173.

- Machado, R.Z., Valadao, C.A., Melo, W.R., Alessi, A.C., 1994. Isolation of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* merozoites by ammonium chloride lysis of infected erythrocytes. *Braz J Med Biol Res* 27, 2591-2598.
- M'Fadyean, J., Stockman, S., 1911. A new species of piroplasm found in the blood of British cattle. *J Comp Path* 24, 340.
- Malandrin, L., L'Hostis, M., Chauvin, A., 2004a. Isolation of *Babesia divergens* from carrier cattle blood using in vitro culture. *Vet Res* 35, 131-139.
- Malandrin, L., Marchand, A.M., Chauvin, A., 2004b. Development of a microtitre-based spectrophotometric method to monitor *Babesia divergens* growth in vitro. *J Microbiol Methods* 58, 303-312.
- Malandrin, L., Jouglin, M., Moreau, E., Chauvin, A., 2009. Individual heterogeneity in erythrocyte susceptibility to *Babesia divergens* is a critical factor for the outcome of experimental spleen-intact sheep infections. *Vet Res* 40, 25.
- Malandrin, L., Jouglin, M., Sun, Y., Brisseau, N., Chauvin, A., 2010. Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. *Int J Parasitol* 40, 277-284.
- McCosker, P.J., 1981. The global importance of babesiosis. In Ristic, M. and Kreier, J.P. (eds.), *Babesiosis*. Academic Press, New York, USA, 1-24.
- McElwain, T.F., Perryman, L.E., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1987. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. *J Immunol* 138, 2298-2304.
- McElwain, T.F., Perryman, L.E., Musoke, A.J., McGuire, T.C., 1991. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 47, 213-222.
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1984. The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv Parasitol* 23, 37-103.
- Mehlhorn, H., Walldorf, V., 1998. Life cycles in Parasitology in Focus: facts and trends. Ed : H. Mehlhorn, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1-147
- Menard, R., 2000. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes Infect* 2, 633-642.

- Mikkelsen, R.B., M., K., Wadwa, K.S., Lin, P.-S., Schmidt-Ullrich, R., 1988. The role of lipids in *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes: A coordinated biochemical and microscopic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5956-5960.
- Montero, E., Rafiq, S., Heck, S., Lobo, C.A., 2007. Inhibition of human erythrocyte invasion by *Babesia divergens* using serine protease inhibitors. *Mol Biochem Parasitol* 153, 80-84.
- Montero, E., Rodriguez, M., Oksov, Y., Lobo, C.A., 2009. *Babesia divergens* apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell. *Infect Immun* 77, 4783-4793.
- Morahan, B.J., Wang, L., Coppel, R.L., 2009. No TRAP, no invasion. *Trends Parasitol* 25, 77-84.
- Moreau, E., Jouglin, M., Chauvin, A., Malandrin, L., 2009. *Babesia divergens* experimental infection of spleen-intact sheep results in long-lasting parasitemia despite a strong humoral response: preliminary results. *Vet Parasitol* 166, 205-211.
- Mosqueda, J., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 2002a. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. *Infect Immun* 70, 6448-6455.
- Mosqueda, J., McElwain, T.F., Stiller, D., Palmer, G.H., 2002b. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect Immun* 70, 1599-1603.
- Murase, T., Iwai, M., Maede, Y., 1993. Direct evidence for preferential multiplication of *Babesia gibsoni* in young erythrocytes. *Parasitol Res* 79, 269-271.
- Narum, D.L., Thomas, A.W., 1994. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 67, 59-68.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L., O'Connor G.R., 1983. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastructure Res* 83, 85-98.
- Nilsson, O., Nordkvist, M., Ryden, L., 1965. Experimental *Babesia divergens* infection in reindeer (*Rangifer tarandus*). *Acta Vet Scand* 6, 353-359.

- Noe, A.R., Adams, J.H., 1998. *Plasmodium yoelii* YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhoptry proteins. *Mol Biochem Parasitol* 96, 27-35.
- Palmer, G.H., McElwain, T.F., Perryman, L.E., Davis, W.C., Reduker, D.R., Jasmer, D.P., Shkap, V., Pipano, E., Goff, W.L., McGuire, T.C., 1991. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. *Infect Immun* 59, 3340-3342.
- Perkins, M.E., 1992. Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol Today* 8, 28-32.
- Phillips, R.S., 1984. *Babesia divergens* in splenectomised rats. *Res Vet Sci* 36, 251-255.
- Precigout, E., Gorenflot, A., Valentin, A., Bissuel, G., Carcy, B., Brasseur, P., Moreau, Y., Schrevel, J., 1991. Analysis of immune responses of different hosts to *Babesia divergens* isolates from different geographic areas and capacity of culture-derived exoantigens to induce efficient cross-protection. *Infect Immun* 59, 2799-2805.
- Precigout, E., Delbecq, S., Vallet, A., Carcy, B., Camillieri, S., Hadj-Kaddour, K., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., 2004. Association between sequence polymorphism in an epitope of *Babesia divergens* Bd37 exoantigen and protection induced by passive transfer. *Int J Parasitol* 34, 585-593.
- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L., Jarra, W., 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* 2, 1461-1477.
- Purnell, R.E., Lewis, D., Holman, M.R., Young, E.R., 1981. Investigations on a *Babesia* isolated from Scottish sheep. *Parasitology* 83, 347-356.
- Reduker, D.W., Jasmer, D.P., Goff, W.L., Perryman, L.E., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1989. A recombinant surface protein of *Babesia bovis* elicits bovine antibodies that react with live merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 35, 239-247.
- Rich, S.M., Ferreira, M.U., Ayala, F.J., 2000. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 16, 390-396.
- Rodriguez, S.D., Buening, G.M., Vega, C.A., Carson, C.A., 1986. *Babesia bovis*: purification and concentration of merozoites and infected bovine erythrocytes. *Exp Parasitol* 61, 236-243.
- Ruef, B.J., Dowling, S.C., Conley, P.G., Perryman, L.E., Brown, W.C., Jasmer, D.P., Rice-Ficht, A.C., 2000. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol* 105, 1-12.

- Sam-Yellowe, T.Y., Shio, H., Perkins, M.E., 1988. Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. *J. Cell. Biology* 106, 1507-1513.
- Sam-Yellowe, T.Y., Fujioka, H., Aikawa, M., Messineo, D.G., 1995. *Plasmodium falciparum* rhoptry proteins of 140/130/110 kd (Rhop-H) are located in an electron lucent compartment in the neck of the rhoptries. *J Eukaryot Microbiol* 42, 224-231.
- Sam-Yellowe, T.Y., 1996. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today* 12, 308-316.
- Savini, G., Conte, A., Semproni, G., Scaramozzino, P., 1999. Tick-borne diseases in ruminants of Central and Southern Italy: epidemiology and case reports. *Parassitologia* 41 Suppl 1, 95-100.
- Sawai, H., Otani, H., Arisue, N., Palacpac, N., Oliveira Martins, L. de, Pathirana, S., Handunnetti, S., Kawai, S., Kishino, H., Horii, T., Tanabe, K., 2010. Lineage-specific positive selection at the merozoite surface protein 1 (*mSP1*) locus of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *BMC Evolutionary Biology* 10, 19 February 2010.
- Schuster, F.L., 2002. Cultivation of *Babesia* and *Babesia*-like blood parasites: agents of an emerging zoonotic disease. *Clin Microbiol Rev* 15, 365-373.
- Siddiqui, W.A., Kan, S.C., Kramer, K., Richmond-Crum, S.M., 1979. In vitro production and partial purification of *Plasmodium falciparum* antigen. *Bull World Health Organ* 57 Suppl 1, 75-82.
- Silva, M.G., Henriques, G., Sanchez, C., Marques, P.X., Suarez, C.E., Oliva, A., 2009. First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. *Vet Parasitol* 166, 66-72.
- Singh, S.K., Singh, A.P., Pandey, S., Yazdani, S.S., Chitnis, C.E., Sharma, A., 2003. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. *Bio-chem. J.* 374, 193-198.
- Skuce, P.J., Mallon, T.R., Taylor, S.M., 1996. Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*. *Mol Biochem Parasitol* 77, 99-102.

- Soldati, D., Dubremetz, J.F., Lebrun, M., 2001. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 31, 1293-1302.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of ticks*. Oxford University Press, Inc., New York, USA.
- Suarez, C.E., McElwain, T.F., Stephens, E.B., Mishra, V.S., Palmer, G.H., 1991a. Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol* 49, 329-332.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Hines, S.A., Perryman, L.E., McElwain, T.F., 1991b. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Mol Biochem Parasitol* 46, 45-52.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Hines, S.A., McElwain, T.F., 1993. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. *Infect Immun* 61, 3511-3517.
- Suarez, C.E., Thompson, S.M., McElwain, T.F., Hines, S.A., Palmer, G.H., 1994. Conservation of oligopeptide motifs in rhoptry proteins from different genera of erythroparasitic protozoa. *Exp Parasitol* 78, 246-251.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Hotzel, I., McElwain, T.F., 1998. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. *Mol Biochem Parasitol* 93, 215-224.
- Suarez, C.E., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T.F., 2000. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. *Infect Immun* 68, 6865-6870.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Hotzel, I., McElwain, T.F., 2003. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. *Mol Biochem Parasitol* 127, 101-112.
- Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., Menard, R., 1997. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell* 90, 511-522.
- Tampieri, M.P., Galuppi, R., Bonoli, C., Cancrini, G., Moretti, A., Pietrobelli, M., 2008. Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 667-674.

- Tanabe, K., Escalante, A., Sakihama, N., Arisue, N., Horii, T., Culleton, R., Hayakawa, T., Hashimoto, T., Pathirana, S., Handunnetti, S., 2007. Recent independent evolution of msp1 polymorphism in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 156, 74-79.
- Taylor, R.J., McHardy, N., 1979. Preliminary observations on the combined use of imidocarb and *Babesia* blood vaccine in cattle. *J South African Vet Assoc* 50, 326-329.
- Terkawi, M.A., Amornthep, A., Ooka, H., Aboge, G., Jia, H., Goo, Y.K., Nelson, B., Yamagishi, J., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Kawazu, S.I., Fujisaki, K., Xuan, X., 2009. Molecular characterizations of three distinct *Babesia gibsoni* rhoptry-associated protein-1s (RAP-1s). *Parasitology* 136, 1147-1160.
- Tomley, F.M., Billington, K.J., Bumstead, J.M., Clark, J.D., Monaghan, P., 2001. EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats. *Int J Parasitol* 31, 1303-1310.
- Valentin, A., Precigout, E., L'Hostis, M., Carcy, B., Gorenflot, A., Schrevel, J., 1993. Cellular and humoral immune responses induced in cattle by vaccination with *Babesia divergens* culture-derived exoantigens correlate with protection. *Infect Immun* 61, 734-741.
- von Itzstein, M., Plebanski, M., Cooke, B.M., Coppel, R.L., 2008. Hot, sweet and sticky: the glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 24, 210-218.
- Welch, W.H., 1897. Adaptation in Pathological Processes. *Science* 5, 813-832.
- Wengelnik, K., Spaccapelo, R., Naitza, S., Robson, K.J., Janse, C.J., Bistoni, F., Waters, A.P., Crisanti, A., 1999. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J* 18, 5195-5204.
- Wilkowsky, S.E., Farber, M., Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Zamorano, P.I., Dominguez, M., Suarez, C.E., Florin-Christensen, M., 2003. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Mol Biochem Parasitol* 127, 133-141.
- Withers-Martinez, C., Jean, L., Blackman, M.J., 2004. Subtilisin-like proteases of the malaria parasite. *Mol Microbiol* 53, 55-63.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51, 221-271.

- Yamasaki, M., Otsuka, Y., Yamato, O., Tajima M., Maede Y., 2000. The cause of the predilection of *Babesia gibsoni* for reticulocytes J Vet Med Sci 62, 737-741.
- Yamasaki, M., Yamato, O., Hossain, M.A., Jeong, J.R., Chang, H.S., Satoh, H., Maede, Y., 2002. *Babesia gibsoni*: preferential multiplication in reticulocytes is related to the presence of mitochondria and a high concentration of adenosine 5'-triphosphate in the cells. Exp parasitol 102, 164-169.
- Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C., Igarashi, I., 2002. Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. Infect Immun 70, 5822-5826.
- Yokoyama, N., Okamura, M., Igarashi, I., 2006. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. Vet Parasitol 138, 22-32.
- Young, A.S., Morzaria, S.P., 1986. Biology of *Babesia*. Parasitol Today 2, 211-219.
- Zhou, J., Fukumoto, S., Jia, H., Yokoyama, N., Zhang, G., Fujisaki, K., Lin, J., Xuan, X., 2006a. Characterization of the *Babesia gibsoni* P18 as a homologue of thrombospondin related adhesive protein. Mol Biochem Parasitol 148, 190-198.
- Zhou, J., Yang, J., Zhang, G., Nishikawa, Y., Fujisaki, K., Xuan, X., 2006b. *Babesia gibsoni*: An apical membrane antigen-1 homologue and its antibody response in the infected dogs. Exp Parasitol 114, 329-333.
- Zhou, J., Jia, H., Nishikawa, Y., Fujisaki, K., Xuan, X., 2007. *Babesia gibsoni* rhoptry-associated protein 1 and its potential use as a diagnostic antigen. Vet Parasitol 145, 16-20.
- Zintl, A., Westbrook, C., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Gray, J.S., 2002. Invasion, and short- and long-term survival of *Babesia divergens* (Phylum Apicomplexa) cultures in non-bovine sera and erythrocytes. Parasitology 124, 583-588.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., Gray, J.S., 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin Microbiol Rev 16, 622-636.

ANNEXES

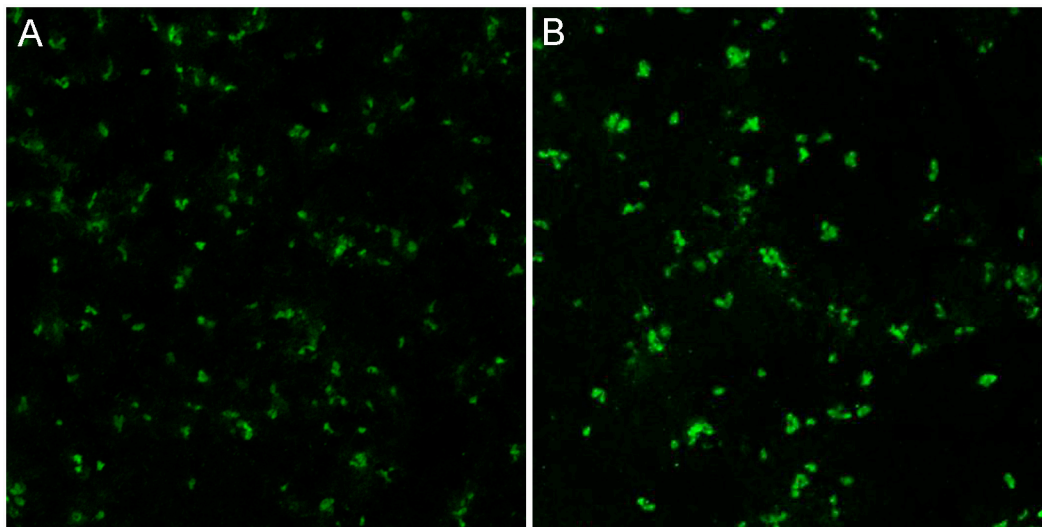
Annexe 1. Alignement des séquences nucléotidiques du gène ADNr 18S de *B. capreoli* et *B. divergens*

```

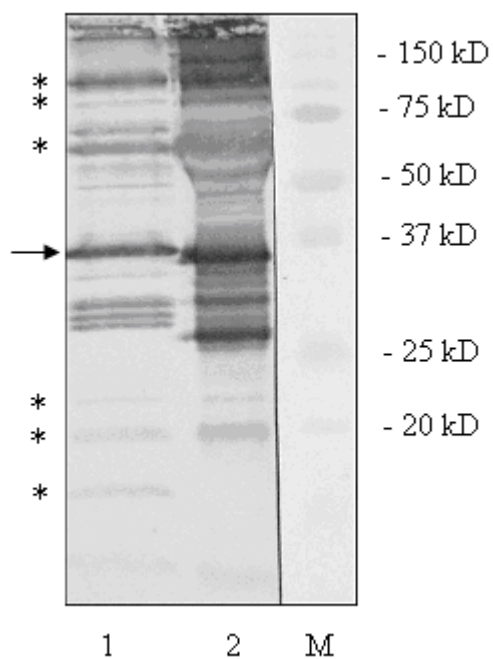
B. capreoli  AAACCTGGTTGATCCCTGCCAGTAGTCAATATGCTTGCTTAAAGATTAAAGCCATGCCATGCTCTAAAGTACAAAACCTTTTACGGTGAACCTGGCAATGGCTCATACAAACAGTTATAAGTTTCTT
120
B. divergens  .....
B. capreoli  TGGTATTTCTGTTTCCAATGGATAAACCGTGCTAAATGTAGGGCTAAACAAAGTTCGAGGCCCTTTTGGCCGCTTATAGTTCTAAAAACCATCCCTTTTGGTTTTCGGTGAATCATATAAAA
240
B. divergens  .....
B. capreoli  CTTTGGCAAATCGCAAATTTTGTTCGATGGACCATTGACCCCATCAAGTTTCTGACCCCATCAGCTTGACGGTAGGTTATTGGCCCTACCGAGGCACAAACGGGTAAACGGGAAATTAGSSTTCGATTCGGGAG
360
B. divergens  .....
B. capreoli  IGGGAGCCCTGAGAAAACGSSCTACCACATCCAAAGSAAAGGCACAGSSCCGCAAAATTACCCAAATCCCTGACACAGGGAGGTAGTGCACAAAGAAAATAACAAATACAGGGCAATTGTCTTGTAAATTGG
480
B. divergens  .....
B. capreoli  AATGATGGTGAACCTAAAACCCCTACCCAGAGTAAACAAATGGAGSSCAAGTCTGGTGCACAGACCCGCGSATAATCCAGCTCCAAATAGCGTATAATTAAAACTTGTTCAGTAAAAAAGSCTCCTA
600
B. divergens  .....
B. capreoli  GTTTGAATTTTGGCTGGTGGTAAATTTGACTGATGTCGAGATGTCACCTTCGCTTTTGGGATTTTTCCTTTTACTTTTSAGAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGACTTTTGTCTTTGSAATAC'
720
B. divergens  .....A.....A.....
TTTCAGCATGGAAATAATAGASTAGGACTTTTGGTCTATTTTGTGGTGTGTGAAACCTTAGTAATGGTTAATAGSAAACGGTTGGGGCATTCCGTAATTAACCTGTACAGAGTGAAAAATTCCTTAG
840
B. capreoli  .....
B. divergens  .....
ATTTTGTAAAAGACGAACTACTGCGAAAAGCATTGCCCAGGACGTTTTCATTAATCAAGAAACGAAAAGTTAGSSGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCCTAACCATAAAACTATGGC
960
B. capreoli  SACTAGGATGGAGGTCGTCATTTTCCGATCCTTCAGCACCTTGAGAGAAAATCAAAGTCTTTGGGTCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAAACCTAAAAGGAAATGACGGGAAG
1080
B. divergens  .....
CACCAACAGCCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAAATCACAGGTCAGACAAATGTAGGATTTGACAGATTTAGCTCTTTCTTTGATCTTTGGGTGGTGGTGC
1200
B. capreoli  ATGGCCGTTCTTATGTTGGTGGAGTGAATTTGTCCTGGTAAATCCGTTAACGAAACGAGACTTAACCTGCTAACTAGTGCCCGTAAAAAAGGTTCCGTCCGTTACGGTTTGGTCTTTAGAGSSA
1320
B. divergens  .....

```

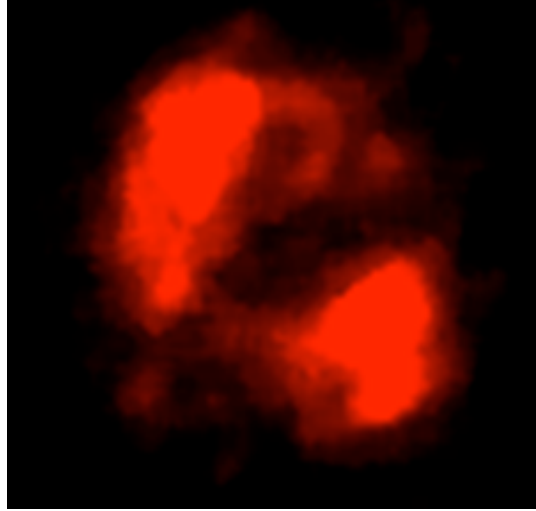

Annexe 2. 1) Réactions sérologiques croisées entre *B. capreoli* 2801 et *B. divergens* Rouen 87 F5 observées en utilisant un anticorps polyclonal de lapin immunisé avec des extraits de mérozoïtes de *B. divergens* (multi-souches). A) *B. capreoli* 2801 ; B) *B. divergens* Rouen 87 F5



2) Analyse par Western blot des protéines responsables de réactions sérologiques croisées observées en IFAT. 1, *B. capreoli* 2770; 2, *B. divergens* Rouen87 F5; M, Marqueurs (Bio-Rad). Les protéines reconnues sont indiquées par les étoiles (*), et une protéine immunodominante de 38kDa est marquée par une flèche



Annexe 3. Marquage de la surface du mérozoite de *B. divergens* Rouen 87 F5 l'anticorps monoclonal 5D6 qui reconnaît Bd37.



Annexe 4. Alignement des séquences nucléotidiques du gène rap-1 de *B. divergens* Drumanness et Rouen 87 F5 (Skuce et al., 1996 ; référence Genbank : Z49818.1)

```

Drumanness ATGAAGGGATTCTCAAGGATTGTTGTTTCGGCTTGTGTGGTAGCTACCCAAAATCTACTTTTGGCTTAGACACGACGCGCAGAAATGGCCGCAATGGTGGCTCTTTGGCGAAGCCCTGATAGCCGT 120
Rouen 87 F5 .....

Drumanness CGCTGAAGCCATTGAGACAGATCGATTCTGTCA TGGCCGCTATCCAGGAAAGCGTGAAGACTATGGA TAAACA TGA TTGCCCACTGTGCTTACCCGCTCCGAGGGCTTTGTTGATGATGTTTG 240
Rouen 87 F5 .....

Drumanness CCAGGGTCTAACGAGGATCCCAAGTCCAGTCCGTCGCCAAGAAATCCGTTAGTCTGTTGCA TTTCAAACCGGGCTGCCCTCAAGATTGACCCAGAGAGATTGCCCCCTGAGAAAAGGAAACCA 360
Rouen 87 F5 .....

Drumanness ACCGTTAGCCTTTCCCAACCCCTTACCAAAGTGGCCGCTGCTTTCCAAATGTTCCAGGAGTCCGACTCCGGAACCCCAAGAAACCTAA TGGCAATTTTGGGATGCGGTTCAAAGCATGGTGG 480
Rouen 87 F5 .....

Drumanness TCGTTACGGTGCCTTACCAGAGCTTATAATGAACGTTGTAACGTCCTCCAGCTACACTCACTGTTGTCAGCAACACCCGAAAGTGGAGGACTTGGTTAA CAGGTA C C C T C T A C A T G G C C C A C C A 600
Rouen 87 F5 .....

Drumanness CTACAAGACGTACCCTCATCCCTSSACACCCACCAAGGTTCTGATTAACAAGATCCGACTTTGGGCA T C A C A C T C C C G S C A A G A G C A T T A A S C A C A T G G T T G A S A A G A T C A T T C C S T A A C C A 720
Rouen 87 F5 .....

Drumanness TCTCCCCAGGSAATTCGGCATCTACAGCATTGAGAGGCTGAGCCACATTAAGCCGSSCTACGGTGACTACATTC T C A A G C A G S T T C C G T A T A T G C C T G C A T T C T C T A C T C G C T T C A A C A G 840
Rouen 87 F5 .....

Drumanness GATGGTCGTAGATACCCCTCCACAAGATCATCGGTAAATCCAGAAATGCCATGGTACAAGAAA TGGTTACAAGAAA TGGTTCAA CAGATGTTGCAGACTTCTTCAAAGAACAGCATTTGGAAAAGCCCTATCCAAAAA 960
Rouen 87 F5 C.....

Drumanness CTTGTTCAGCAAAGCTGCTCCATCTTCTTCTACTGAGGGGGCATGGSCAAAGAAAGGTTTCTCACTCTGTGAAGAAAGATGTTAAAACGAGAAAGATCCCTGTTGTAAAGAA TTTCTTTC T T C A A G G A 1080
Rouen 87 F5 .....

Drumanness CCGCATTAGGAAGAGCTCTCTGGGTGATTTGCTGCATGGACCTTAGGCCCTCATCCATGAAAAGGGA TGAAGTTCCCTCTGACCGAAAGCCATGGAGACCCAACGAGACACCGGGAGAGAAACCTT 1200
Rouen 87 F5 .....

Drumanness CAGGGGTTACAGGCA TGGACTCCGCTGACACCCAAAGAAAACCGAG 1240
Rouen 87 F5 .....

```

Annexe 5. Carte de distribution géographique des clones de *B. divergens* échantillonnés pour les analyses de conservation du gène *rap-1*





UNIVERSITÉ DE NANTES

Division de la recherche et des écoles doctorales
Bureau des études doctorales & Coordination des écoles doctorales

RESUMÉ et MOTS CLÉS

TITRE EN FRANÇAIS : Caractérisation moléculaire, localisation cellulaire et conservation des protéines impliquées dans le processus d'invasion des érythrocytes par *Babesia divergens*

Babesia divergens est un protozoaire Apicomplexe transmis par la tique *Ixodes ricinus*, et parasite obligatoire des globules rouges de son hôte vertébré naturel, le bovin. L'objectif général de mon travail de thèse est d'apporter des connaissances sur l'invasion de l'érythrocyte par *B. divergens* au niveau cellulaire (étapes du processus d'invasion) et moléculaire (caractérisation de protéines impliquées). L'étude de la conservation inter- et intra-espèce des gènes impliqués dans l'invasion est réalisée afin d'aborder leur rôle potentiel dans la barrière de spécificité de cette interaction *Babesia*- globule rouge. Dans ce cadre, j'ai participé à la redescription de *B. capreoli*, espèce phylogénétiquement proche de *B. divergens*, présentant une gamme d'hôtes chevauchante, permettant de ce fait d'étudier la barrière d'espèce. J'ai ensuite caractérisé chez *B. capreoli* le gène *Bcp37/41*, un orthologue de l'antigène de surface du mérozoite Bd37 de *B. divergens*. La conservation chez ces deux orthologues d'acides aminés potentiellement impliqués dans l'adhésion au globule rouge, et ce malgré un fort niveau de polymorphisme intra- et inter-espèces, suggère leur interaction non spécifique avec le globule rouge. Afin d'étudier les interactions *B. divergens*-érythrocyte, un test d'invasion mis au point a permis de démontrer la rapidité du processus d'invasion (moins de 45s) et l'invasion simultanée possible d'une hématie par deux parasites. Ce test a été utilisé pour étudier l'expression de *rap-1* (rhopty-associated-protein) au cours du cycle cellulaire. La localisation de RAP-1 dans les rhoptries, son rôle dans l'invasion et son faible polymorphisme génétique ont été déterminés.

Mots clés : *Babesia divergens*, *Babesia capreoli*, invasion, érythrocyte, complexe apical, Bd37, RAP-1, Polymorphisme

TITRE EN ANGLAIS Molecular characterization, cellular localization and conservation of proteins involved in the invasion process of erythrocyte by *Babesia divergens*

Babesia divergens is an hemoprotozoan Apicomplexa that infects mainly cattle and which is transmitted by the tick *Ixodes ricinus*. The general goal of my PhD work is to improve the knowledge on *B. divergens* invasion of erythrocyte at the cellular (invasion steps) and molecular levels (characterization of proteins involved). The study of intra- and inter-specific conservation of the genes related to the invasion process should give insights into the species-specific steps of *Babesia*-erythrocyte interactions. In that goal, I have collaborated to the redescription of *B. capreoli*, a *B. divergens* phylogenetically related species. The overlapping host range and the relatedness of these two close species are key advantages for the study of host specificity. I therefore characterized in *B. capreoli* the gene *Bcp37/41*, an ortholog of the merozoite surface antigen Bd37 of *B. divergens*. Despite a high intra- and inter-specific polymorphism, the conservation in these two orthologs of residues potentially involved in parasite adhesion to red blood cell suggests their non specific interaction with the erythrocyte. To further study *B. divergens*-erythrocyte interactions, an invasion test was set up and used to demonstrate the speed of the invasion process (less than 45s) and the possibility of the simultaneous invasion of one RBC by two merozoites. This test has been used to study *rap-1* (rhopty-associated-protein 1) expression in the course of the cell cycle. RAP-1 localization in rhopty bulbs, its role in invasion and its low genetic polymorphism have also been determined.

Mots clés : *Babesia divergens*, *Babesia capreoli*, invasion, erythrocyte, apical complex, Bd37, RAP-1, Polymorphism

NOM Prénom SUN Yi
Adresse : 33bis route de la Jonelière
Code Postal – Ville : 44300 Nantes

Visa du Directeur de thèse