



HAL
open science

Modification des traits d'histoire de vie au cours de l'hybridation et analyse des mécanismes moléculaires sous-jacents chez les parasites plathelminthes du genre *Schistosoma*

Julien Kincaid Smith

► **To cite this version:**

Julien Kincaid Smith. Modification des traits d'histoire de vie au cours de l'hybridation et analyse des mécanismes moléculaires sous-jacents chez les parasites plathelminthes du genre *Schistosoma*. Parasitologie. Université de Perpignan, 2018. Français. NNT : 2018PERP0028 . tel-01957582

HAL Id: tel-01957582

<https://theses.hal.science/tel-01957582v1>

Submitted on 17 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par
UNIVERSITÉ DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale
Énergie Environnement ED305

Et de l'unité de recherche
**Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE)
UMR5244**

Spécialité : **Biologie**

Présentée par
Julien Kincaid-Smith

**Modification des traits d'histoire de vie au
cours de l'hybridation et analyse des
mécanismes moléculaires sous-jacents chez les
parasites plathelminthes du genre *Schistosoma***

Soutenue le 20 Novembre 2018 devant le jury composé de

M. ESCRIVA Hector, DR, CNRS, UMR7232	Rapporteur
M. BIERNE Nicolas, DR, CNRS, UMR5554	Rapporteur
Mme. HUYSE Tine, Senior Researcher, KU Leuven	Examinatrice
Mme. BELTRAN-BECH Sophie, MC, UMR7267	Examinatrice
M. GRUNAU Christoph, PR, UPVD UMR5244	Examineur
Mme Eve TOULZA, MC, UPVD UMR5244	Co-directrice de thèse
M. Jérôme BOISSIER, PR, UPVD UMR5244	Directeur de thèse





Au moins les Sud-Africains savent à quoi s'en tenir... (Afrique du Sud, Janvier 2015

@Julien Kincaid-Smith).

Le présent travail de thèse a été valorisé à travers des communications dans différents congrès internationaux et nationaux, et fait l'objet de plusieurs publications (ci-dessous). Par souci de cohérence, certaines de ces publications ne feront pas partie intégrante de la construction de ce manuscrit. En revanche, elles s'intègrent toutes dans une problématique globale visant à mieux appréhender les interactions hôtes-pathogènes et particulièrement au sein du modèle *Schistosoma*. Certains articles sont également en révision (soumis) ou encore en cours de rédaction (en préparation).

Liste des publications et valorisations parues

- Boissier, J. Grech-Angelini, S. Webster, B.L. Allienne, J.F. Huyse, T. Mas-Coma S., Toulza E., Barre-Cardi H., Rollinson D., **Kincaid-Smith J.**, Oleaga A., Galinier R., Foata J., Rognon A., Berry A., Mouahid G., Henneron R., Mone H., Noel H., Mitta G. (2016). Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, online: 2016 May 16. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00175-4.
- **Kincaid-Smith J.**, Boissier J, Allienne JF, Oleaga A, Djuikwo-Teukeng F, et al. (2016) A Genome Wide Comparison to Identify Markers to Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(11): e0005138. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005138>.
- **Kincaid-Smith J.**, Rey O, Toulza E, Berry A, Boissier J. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. *Trends Parasitol.* Elsevier; 2017; doi:10.1016/j.pt.2017.04.009.
- **Kincaid-Smith, J.**, Picard, M. A., Cosseau, C., Boissier, J., Severac, D., Grunau, C., & Toulza, E. (2018). Parent-of-Origin-Dependent Gene Expression in Male and Female Schistosome Parasites. *Genome biology and evolution*, 10(3), 840-856. doi:10.1093/gbe/evy037.
- **Kincaid-Smith, J.**, Toulza, E., Boissier, J. 2016. La bilharziose en Corse: de la génétique parasitaire aux aspects environnementaux. *Bulletin de Veille Sanitaire*, 20: 4-5.
- Boissier J., **Kincaid-Smith J.**, Berry A., Allienne J.-F., Fillaux J. & Toulza E. 2015. Changements globaux et infections parasitaires a mollusques vecteurs – Un schistosome hybride atteint l'Europe. [Global changes and snail-borne disease: a hybrid schistosome reaches Europe]. *Médecine/Sciences*, 31: 962-964.
- Olivier Rey, **Julien Kincaid-Smith**, Jérôme Boissier. UPVD-RECHERCHE Hors-série de l'Université de Perpignan #10 - Décembre 2017. Changements globaux et maladies infectieuses: le cas de la Bilharziose en Afrique. *p18-25*.

Articles soumis

- **Julien Kincaid-Smith**, Alan Tracey, Ronaldo Augusto, Ingo Bulla, Nancy Holroyd, Anne Rognon, Olivier Rey, Cristian Chaparro, Ana Oleaga, Santiago Mas Coma, Jean-François Allienne, Christoph Grunau, Matthew Berriman, Jérôme Boissier and Eve Toulza. Whole genome sequencing and morphological analysis of the human-infecting schistosome emerging in Europe reveals a complex admixture between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites. (**soumis à The Lancet Infectious Disease**)

- **Julien Kincaid-Smith**, Gabriel Mouahid, Mohammed A. Idris, Salem Habbash, Jean-Francois Allienne, Christoph Grunau, Jérôme Boissier, Guillaume Mitta, Juliette Langand, Hélène Moné and Eve Toulza. Comparative Pop(pool)ation genomics of two chronotypes of the metazoan parasite *Schistosoma mansoni*: insights into adaptation to a new host (**soumis à Ecology and Evolution**) .

- Le Govic Yohann, **Kincaid-Smith Julien**, Allienne Jean-François, Rey Olivier, de Gentile Ludovic, Boissier Jérôme Hybrids Between *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* Parasites Infecting a Migrant (**soumis à Emerging Infectious Diseases**)

- Oleaga A., Polack B., Grech-Angelini S., Pérez-Sánchez. R, Boireau P., Vallée I., **Kincaid Smith J.**, Allienne J.F, Boissier J. Seroepidemiological survey of bovine schistosomiasis on Corsica Island (France) (**soumis à Veterinary Parasitology**)

Articles en préparation

- **Julien Kincaid-Smith**, Cristian Chaparro, Marta Reguera-Gomez, Stephen Mulero, Jean-Francois Allienne, Eve Toulza, Jérôme Boissier¹. Pre-zygotic isolation mechanisms between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites: from mate interactions to differential gene expression

- **Julien Kincaid-Smith**, Cristian Chaparro, Jean-Francois Allienne, Jérôme Boissier, Eve Toulza. Reciprocal first generation *S. haematobium* x *S. bovis* hybrids display heterosis compared to parental species: from life history trait modifications to differentially expressed genes

- **Julien Kincaid-Smith**, Eve Toulza, Jérôme Boissier. Life history traits modification following hybridization and subsequent backcrossing between *S. haematobium* and *S. bovis*.

Liste des congrès et communications

2018

II Joint Congress on Evolutionary Biology in Montpellier, France, August 19-22, 2018

Présentation orale Julien Kincaid-Smith

Session: Consequences of hybridization: from swamping to speciation

Kincaid-Smith, Toulza, Chaparro, Cosseau, Boissier. Is pathogens' hybridization an emerging global threat? The case of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites.

Congrès annuel des Sociétés Françaises de Mycologie Médicale et de Parasitologie, Nice, 2018

Présentation orale Le Govic Yohann

Le Govic Yohann, **Kincaid-Smith Julien**, Allienne Jean-François, Rey Olivier, de Gentile Ludovic, Boissier Jérôme Elimination urinaire d'oeufs à éperon latéral révélant une hybridation naturelle entre *Schistosoma mansoni* et *S. haematobium* : à propos d'un cas et implications épidémiologiques potentielles.

#2017

Molecular helminthology, An Integrated Approach, 19-22 March 2017, Cape Cod, MA, USA

Présentation orale Eve Toulza

Julien Kincaid-Smith, Picard M., Cosseau C., Boissier J., Grunau C., Toulza E. Parent-of-origin gene expression in male and female schistosome parasites: Towards a better understanding of an evolutionary scandal?

Congres des doctorants, Université de Perpignan (UPVD) October 2017

Présentations affichées

Julien Kincaid-Smith, Olivier Rey, Jérôme Boissier et Eve Toulza. L'Émergence de pathogènes hybrides comme menace à l'échelle globale : le cas d'une maladie parasitaire tropicale en Europe.

Julien Kincaid-Smith. L'imperceptible cycle de vie complexe du Schistosome (Photographie).

#2016

EMOP XII – the 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku, Finland, July 20-24th 2016

Présentation orale Julien Kincaid-Smith

Session: Development, differentiation and gene expression of parasitic organisms

Julien Kincaid-Smith, Marion A.L. Picard, Céline Cosseau, Jérôme Boissier, Christoph Grunau, Eve Toulza - Parental allele-specific gene expression in female and male schistosome parasites

Présentation affichée

Session: 5th KE Mott symposium on schistosomes and flukes

Sonia Adam, **Julien Kincaid-Smith**, Alberto Martínez-Ortí, M.Dolores Bargues, Jérôme Boissier, Guillaume Mitta, Giovanni Garippa, Santiago Mas-Coma. Urogenital schistosomiasis introduction risk in Mediterranean Europe: biological characterisation of the vector *Bulinus truncatus* from a high immigration area in southern Spain

Présentation orale Jérôme Boissier

Jérôme Boissier, Sébastien Grech-Angelini, Bonnie L. Webster, Jean-François Allienne, Tine Huyse, Santiago Mas-Coma, Eve Toulza, David Rollinson, **Julien Kincaid-Smith**, Ana Olealga, Hélène Barré-Cardi, Richard Galinier, Joséphine Foata, Anne Rognon, Antoine Berry, Gabriel Mouahid, Remy Henneron, Hélène Moné, Harold Noel, Guillaume Mitta - Epidemiology and molecular characterization of the recent outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France).

#2014

Bioinformatics for Environmental Genomics workshop, 27-28 May 2014, Lyon

Présentation orale Eve Toulza

Toulza, E., **Kincaid-Smith, J.**, Mouahid, G., Allienne, J.F., Grunau, C., Boissier, J., Mitta, G., Langand, J., Moné, H. Comparative Pop(pool)ation genomics of two chronotypes of the metazoan parasite *Schistosoma mansoni* : insights into adaptation to a new host?

Conférences Jacques Monod « Les maladies infectieuses comme moteur de l'évolution : les défis à venir », 6-10 Septembre 2014, Roscoff

Présentation orale Eve Toulza

Toulza, E., **Kincaid-Smith, J.**, Mouahid, G., Allienne, J.F., Grunau, C., Boissier, J., Mitta, G., Langand, J., Idris, M., Habbash, S., Moné, H. Host shift in the platyhelminth *Schistosoma mansoni*: searching for the basis of parasite chronobiology using pop(pool)ation genomics.

Remerciements

Je souhaite commencer par remercier les membres ce jury de thèse :

M. **Hector Escriva**, M. **Nicolas Bierne**, Mme. **Tine Huyse**, Mme. **Sophie Beltran-Bech** et M. **Christoph Grunau**. Merci d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail. J'espère que celui-ci aiguillera votre curiosité et que nous pourrons en discuter prochainement.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des personnes qui se sont tenu à mes côtés pendant ces trois années de thèse. Certains ont contribué à ce travail en mettant la main à la pâte tandis que d'autres ont été grâce à leur présence d'un soutien psychologique important. En tout cas, tous vous avez fait partie de cette aventure et je vous en suis reconnaissant. Je ne le dirai jamais assez mais ce fut pour moi plus une réelle expérience de vie et j'ai beaucoup appris de la science et de vous. Il ne s'agit pas simplement de vous remercier mais aussi de vous rappeler ce qui nous a unis, nos souvenirs et en quelque sorte de vous faire honneur. L'ordre des noms qui apparaissent dans cette section de remerciement n'a pas d'importance comme dans nos publications scientifiques pour exposer la contribution de chacun, mais plutôt, je ferais appel ici à mes souvenirs. Peut-être qu'ainsi je n'oublierais personne.

Mon premier pied dans le monde de la recherche remonte à mon stage de licence 3 à l'UPVD en compagnie de **Benjamin Gourbal**. À cette époque le laboratoire s'appelait le « 2EI » (Écologie et Évolution des Interactions). Ce stage consisté à « mettre au point techniquement un protocole analyser par cytométrie en flux les hémocytes circulants chez *Biomphalaria glabrata* ». Difficile de s'attendre à quoi que ce soit à cette époque, mais visiblement ça a eu son effet sur moi, merci Benjamin. Il y a certains professeurs comme toi qui te marque et je pense que tu en fais partie pour beaucoup d'étudiants. C'est peut être grâce à ta gentillesse et ton accessibilité. Merci beaucoup en tout cas pour cette initiation dans la recherche, et tes conseils. Merci également pour tout ce que tu fais dans ton rôle de « responsable de vie de site » mais aussi simplement pour ta bonne humeur.

L'aventure s'est poursuivie en master 1 cette fois sous la direction de **Eve Toulza** et **Hélène Moné**. J'ai commencé à m'intéresser au « parasite », et le projet consistait en la « comparaison de séquençage de deux chronotypes du parasite plathelminthe *Schistosoma mansoni* ». Ce stage entre l'écologie parasitaire et le moléculaire m'a vraiment plu. **Ève** je reviendrai à toi un peu plus tard car j'ai pas mal de chose à dire mais je pourrai enlever un peu de suspense en te rappelant notre première « rencontre » ou plutôt entretiens d'embauche... Je me souviens avoir discuté avec toi sur mes motivations, et que ta première question était de savoir si je pouvais te définir une « fréquence allélique ». J'en avais qu'une vague idée à l'époque, mais tu m'as donné ma chance... comme quoi tu ne t'es pas trompé ;)).

Hélène, merci pour ton encadrement à cette époque et ta rigueur légendaire, d'autres ont connu ça avant moi et même à l'armée ils sont peut-être moins exigeants. En tout cas merci car c'est formateur et c'est toujours le bienvenu pour des étudiants comme moi. Merci pour le moment qu'on a partagé pour reprendre le papier « chronotype Omanais » ça a pris du temps mais comme on dit, il vaut mieux tard que jamais. Merci également à **Gabriel Mouahid** pour nos échanges pendant cette période, ta gentillesse et ta bonne humeur. Je regrette peut-être qu'une chose c'est de ne pas avoir échangé plus avec vous deux pendant ma thèse. Je pense que ça aurait été enrichissant pour nous tous. Quoi qu'il en soit bonne continuation à vous et une très bonne continuation.

Je pense que le meilleur moment pour te remercier **Julliette Langand** c'est maintenant. Très impliqués à l'époque dans le projet « chronotype Omanais », nous avons eu l'occasion de pas mal échanger sur la génétique des pops. Merci pour tes conseils et tes « cours ». J'ai également pas mal eu l'occasion de te croiser lors de mes « aller-retour » dans votre bureau pour voir **Ève** et j'ai eu droit à tous les commentaires possibles en fonction des têtes que je faisais. Tu savais quand ça allait et quand j'allais me plaindre et ça me fait beaucoup rire quand j'y repense. Merci aussi pour ta spontanéité et ta simplicité, mais aussi pour ton attention car tu es souvent à l'écoute des gens et particulièrement présente pour tes étudiants. Je te souhaite de la réussite dans ton nouveau projet « local ».

Les ennuis ont commencé à partir de ce moment-là (ahahah...). J'avais été pris pour partir faire un stage de fin d'année de master 2 à la Réunion (oui oui à la Réunion), près de mon

pays natal et dans des conditions idéales pour moi qui veux voyager depuis toujours. Cependant, on avait vraisemblablement un autre plan pour moi... et je ne regrette rien au contraire. Je me souviens d'une réunion avec vous **Eve Toulza** et **Jérôme Boissier**, vous m'avez proposé ce fameux stage sur « l'identification de gènes à empreinte parentale chez des mâles et des femelles du parasite *Schistosoma mansoni* » (nom officiel je précise) qui s'intégrait dans le projet de thèse de **Marion Picard** avec des offres alléchantes... poursuivre en thèse, faire du terrain en Afrique, en Corse et de travailler sur du « concret » (vous savez bien vous vendre quand même hein !? ;)). La raison a pris le dessus et j'ai décidé de rester pour le meilleur et pour le pire. Franchement il y a eu des moments difficiles même si vous ne l'avez peut-être pas vue, mais globalement, je me suis éclaté pendant ces trois années !

Marion, merci de m'avoir confié une partie de ton travail, et de m'avoir épaulé comme tu l'as fait. Toujours le bon mot pour donner confiance. Je me souviendrai aussi du jour où tu m'as dit en rigolant juste après mon concours à l'ED que j'avais encore le temps de fuir et que je ne savais pas dans quoi je m'embarquais...(ça m'a fait peur !). Je crois que j'ai enfin compris... Merci d'avoir fait la groupie au premier rang lors de ma présentation au congrès à Montpellier. Tu m'as toujours encouragé ! Merci à toi.

Ève et **Jérôme**, sincèrement, je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté. Je vous remercie de m'avoir fait confiance, pour les responsabilités que vous m'avez confiées et tout ce que vous m'avez appris. Vous avez été top avec moi ! Je me souviens que lors d'une présentation aux doctoriales du laboratoire je vous ai inconsciemment hybridé en présentant mes encadrants comme « Ève et Jérôme Boissier ». J'espère en tout cas être le descendant viable de cette hybridation scientifique et j'espère que ma « fitness » académique sera au moins aussi bonne que la vôtre. C'est presque une combinaison parfaite d'allier vos phénotypes contrastés, votre savoir-être et votre savoir-faire, pour le meilleur et pour le pire. **Eve** merci pour ta présence dans les bons et les mauvais moments de la vie et de la thèse (je crois que tu es une des rares personnes à m'avoir vue pleurer, mais je ne m'engage pas trop en vue de la soutenance à venir ☺). Tu n'as jamais oublié un seul de mes anniversaires et j'ai toujours trouvé un petit cadeau sur mon bureau. Merci pour ces attentions car c'est « revigorant ». Je crois aussi que mon premier papier en premier nom était pour toi le premier en dernier... une jolie réussite commune je trouve. Il y a beaucoup d'autres moments qui restent dans ma mémoire, toutes les fois où je suis passé

te voir, pour un bonjour cordialement ou quand j'étais complètement perdu... Simplement merci pour tout. En plus d'être une très bonne scientifique, tu es surtout, je trouve, une personne bien. J'espère que tu vas trouver un peu de calme dans ton activité, en tout cas je te souhaite plein de belles choses pour la suite.

Jérôme, superbe expérience avec toi également au labo dans la salle du vivant, comme sur le terrain. Merci beaucoup de m'avoir emmené avec toi car mine de rien on en a fait des kilomètres entre Turku, Yaoundé, Salamanque, et 3 fois la Corse. Je me souviendrais toujours de ces moments-là, des rencontres, des rires et des moments inimaginables qu'on a pu passer tout en capturant du rat, en chassant la schisto et en travaillant. C'est ça pour moi la science, le partage et la découverte. Pas la peine de raconter nos péripéties sur les routes Camerounaises je pense que tu t'en souviens entre le scooter à trois et la pirogue au-dessus d'un lac de cratère infesté par le schisto... Ton savoir sur le modèle et le vivant m'a nourri pendant ces trois années. Merci pour ton soutien et ta présence. Merci pour ton bavardage incessant, et ton côté humain. Je te souhaite également plein de bonnes choses dans ta carrière scientifique et la nouvelle aventure dans laquelle tu t'es lancé. Comme j'ai dit à **Julien P**; pensez à moi un jour quand vous serez riche svp... D'ailleurs **Julien P** merci à toi aussi ! Je me souviens de toi lors de mon stage L3 mais surtout des heures passées à la paillasse à perfuser du hamster. Je me souviens aussi de tes débuts avec la boîte quand tu essayais d'attraper les hamsters à la pince (et oui c'est moins facile sans la queue hein). Maintenant tes devenu une machine à perfusion ! Merci pour les discussions qu'on a pu avoir pendant ces journées « salle du vivant » à dire n'IMP ! Bonne continuation à toi (et ne m'oubliez pas svp... ;)).

Je remercie aussi sincèrement **Jean-François Allienne** et **Richard Galinier** pour leur présence et leurs conseils bienveillants que ce soit en Bio-mol, dans le couloir ou autre. Difficile d'oublier les pauses-café du matin devant le labo. **Jeff** merci pour tes coups de main à la paillasse je n'ai jamais vu quelqu'un d'aussi efficace, comme dit Jérôme on n'a pas le temps de te demander quelque chose que c'est déjà fait. **Richard**, merci pour ton humour et tes encouragements. Je garde de bons souvenir avec vous. Merci !

Merci aussi à vous les filles **Nathalie Arancibia** et **Cindy Louvet**, on l'oublie parfois mais vous êtes des pièces clé du fonctionnement des projets de recherche au labo. Vous chouchoutez

nos petits animaux ! En plus de ça vous avez toujours été top avec moi, à croire que moi aussi j'étais le petit chouchou. Merci beaucoup pour les moments de rigolade, la déconne et tous le reste. Je vous souhaite que du bon pour la suite.

Un grand merci à **Anne rognon**, pour son expérience sur le vivant mais aussi pour ta bienveillance et ta gentillesse avec moi.

Une pensée pour les femmes de l'ombre **Sylvie Cabal, Diane Merceron, Anne Modat**, on ne s'en rend pas toujours compte non plus mais c'est en partie grâce à vous si on arrive à travailler comme on le fait ! En plus de ça vous avez toujours été très plaisantes. Merci !

Un grand merci à **Olivier Rey**, nouvel arrivant au début de ma thèse mais une grosse plus-value pour le labo et un gars top! En espérant que tu puisses réaliser tous tes projets de terrain ! Merci pour nos discussions, tes conseils et ta bonne humeur ! Je pense que sur certaines choses on est similaire ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite !

Merci également à **Cristian Chapparo**, toujours présent pour le travail mais aussi pour venir passer une soirée avec les jeunes doctorants ! Merci pour ton aide et tes astuces de bioinfo. Merci aussi pour ta gentillesse et tes anecdotes de sud-américain. En tant que pseudo sud-africain, je crois que je te comprends.

Un merci à **Céline Cosseau** et **Christoph Grunau** pour vos conseils. Merci à toi **Céline** pour ta collaboration, d'avoir fait partie des membres de mon CSI et de m'avoir encouragé comme tu l'as fait ! Merci à **Christoph** pour son rôle de chef d'équipe, mais aussi sa bienveillance et sa collaboration. Merci pour ton geste au restaurant près du MégaCastiller lorsque nous (les doctorants) t'avons croisé. C'est peut-être pas grand chose pour certain mais ça témoigne bien de ta gentillesse.

Merci à **David Duval** pour ses commentaires toujours bien pensés et son humour. Comme tu me l'as dit tout à l'heure, j'ai presque 24 pages de remerciements, mais je n'avais pas tout à fait fini... Je te laisse Damien maintenant, il va falloir que tu sois patient et que tu t'en occupes bien ! ;)

Merci à **Guillaume Mitta** directeur du laboratoire de m'avoir permis d'évoluer dans cet environnement. Les doctorants sont privilégiés et c'est en partie grâce à toi ! Merci d'avoir fait « tourner la machine » comme tu le fais !

Une pensée pour les **Montpelliérains**, merci pour les échanges scientifiques et pour les moments de convivialité particulièrement pendant les fameuses doctoriales.

C'est en écrivant cette section qu'en faite je me rends compte du nombre de personnes à qui je dois un petit mot, et par conséquent les personnes présentent autour de moi. Je commencerais par ceux qui m'ont pris en charge lors de mon arrivée en thèse principalement Mr **Silvain Pineau**, et Mme **Anais Portet**. Les gars... ce qui est sûr c'est que la vie au labo n'a jamais plus été la même depuis que vous êtes partie. C'était un plaisir d'aller à notre petit bureau entendre Anaïs râler et Silvain faire tout en son pouvoir pour qu'elle râle encore plus. Depuis j'ai songé plusieurs fois à monter ce Food-Truck et vendre du Fish&Chips. Vous le savais bien l'ultime moment c'était la formation d'expérimentation animale à Marseille pendant l'euro 2016 ! Génial ! Mais je n'oublierais pas non plus notre congrès à « Kiss my Turku », l'élan, et LES bières sur les bateaux ! Merci pour votre présence les bières au Fla, les repas chez vous, les conneries et les discussions embarrassantes avec **Ari**. Merci d'avoir été là pour moi dans les moments un peu compliqués et d'autres plein de rires. Je viens vous voir rapidement ! **Silvain**, (et ton cerveau) merci de constamment donner des anecdotes bidons sur tout et sur rien. **Anais** merci pour ta « fraîcheur » même si tu parles un peu trop le matin et que tu peux être une râleuse incorrigible au travail, ton sourire et ta bonne humeur n'était pas de trop ! Un mot pour **Guillaume Tetreau** avec qui on a passer des moments sympas lors de son passage au labo et de sacrer St Patrick. Un petit mot pour **Cécile Saint Beat** (Cécillette), tu aimais tellement que je t'appelle comme cela... sympa d'avoir fait ta connaissance même si tu t'es rapidement envolé vers d'autres horizons c'est tout à ton honneur. En tout cas toujours un plaisir de te revoir quand tu n'es pas trop fatigué hein ;) ! Les choses ont quand même pas mal changé depuis que tu es partie toi aussi. Plein de bonnes choses ! Un petit mot à **Kelly Brenner** présente au labo pendant ma thèse. On a partagé la même encadrante et du coup on a dû vivre des choses en commun. Je me souviendrai toujours en tout cas d'avoir passé cette aprèm avec toi à essayer de préparer les cours de génétique des pops... c'était tellement bien ! Un petit mot également pour **Ariadna Picart**, merci pour les moments qu'on a passés ensemble et ta joie

de vivre ! Merci à **Ronaldo de Carvalho Augusto**, pour son étroite collaboration sur la morpho des schisto mais aussi pour ta grande gentillesse et les moments qu'on a pu passer ensemble. All the best for the coming years !

Je souhaite aussi remercier le restant des doctorants avec qui j'ai partagé le bureau et pas que... **Aude Lucasson, Manon Fallet, Camille Huot, Stephen Mulero, Nelia Luviano**, et **Boris Savassi**, merci d'avoir fait partie de mon quotidien au laboratoire même si on n'était pas forcément dans le même univers tout les jours. Je vous souhaite plein de courage et de bonne chose pour cette aventure un peu folle qu'est la thèse... une pensée également pour **Aude** qui va soutenir 2 jours après moi ! **Marta Reguera Gómez**, la machine espagnole... Je n'ai jamais vu quelqu'un parler autant, mais c'est sans doute qu'on n'a pas l'habitude. Merci pour ton travail pendant ton séjour au labo et merci pour les bons moments qu'on a passés ! Je te souhaite plein de courage pour le temps qui te reste et du bonheur dans ta vie !

Un gros merci à mes amis **Damien Lassalle** et **Claudine Casas Rodriguez** ! L'histoire est longue et j'ai beaucoup de souvenirs et j'aurais beaucoup de choses à dire. Vous-même savez tout ce qui s'est passé... Cependant, je veux simplement et sincèrement vous remercier pour les moments qu'on a passés ensemble avant que l'aventure commence, pendant et sûrement pour après ! Merci d'être les amis que vous êtes, merci d'avoir et d'être toujours présent pour moi comme vous l'êtes. Je vous souhaite vraiment tout le meilleur. Clo je ne me fais pas de soucis pour toi j'ai confiance. Dams, doutes pas de toi, fonce et soit fière. Ce qui est important c'est d'être honnête avec toi-même. Plein de bises.

Une grosse pensée à mes amis Bordelais (**Seb, Mael, Mike, Ella, Kevin** et vous autre avec qui j'ai grandi). Loin des yeux mais toujours dans mon cœur depuis des années. Je suis partie de Bordeaux et ça était dur de partir de tout ça. Qui de vous aurez mis une main à couper si un jour on vous avait dit que je ferais une thèse ? Hein ? Personne ! Et je pense que nos profs non plus hein Mike ?! Comme quoi... Merci d'être qui vous êtes et d'avoir partagé ce qu'on a pu vivre ensemble. Je viens tous vous voir très bientôt. Je n'irai pas plus loin mais sachez que je vous porte dans mon cœur. Bises

Une pensée également pour mes amis Perpignanais, certains avec qui j'ai commencé l'aventure de la fac et qui ont fait partie de mon quotidien depuis près de 8 ans (**Yoann**,

Antony aka **Réré, Guillaume, Florian, Aurélie** et toute **la Team** qui se reconnaîtra. Désolé, j'oublie du monde mais il est 2h43 et ça fait deux jours que je ne dors pas)). Merci particulièrement à mon ami « **El Réré** », présent pour moi dans tous les moments. T'es un bon gars et j'espère que tu vas trouver le chemin qui te plaît !

Une pensée toute particulière aussi à celle qui fait partie de mon quotidien depuis presque un an maintenant. Mon **Endivette**, j'espère que tu te reconnaîtras... des fois les mots ne valent pas mieux qu'un ressenti hein ?! Merci pour ta présence et ton soutien, tu as été précieuse pour moi.

Je souhaite finir par remercier ma famille, de son soutien sans failles depuis toujours... En premier lieu mon **père**, et ma **mère**, mes exemples... ceux qui ont tout fait pour me voir heureux et épanouie depuis petit. Merci de m'avoir donné la chance de devenir qui je suis aujourd'hui. Merci pour vos attentions et votre amour, votre ouverture d'esprit et simplement votre présence. Je suis très honoré d'avoir des parents comme vous et l'aventure continue ! Merci de faire partie de ma vie. Je vous aime. To my **PA**.

Une grosse pensée à ma grande sœur **Océane** avec qui on a traversé le « monde » pendant notre enfance... toujours présente pour moi ! On a certes pris des chemins de vie différents mais on est lié à jamais ne l'oublie pas. À mon frère **Samuel**. Loin de toi je le sais mais pourtant je suis fier de toi ne l'oublie pas non plus ! Une pensée pour ce futur prince **Jude**, mon neveu, et ma petite sœur **Charlize**, un trésor de la nature. J'ai de la chance de tous vous avoir. Je vous aime.

À **Steph, Franck, Aurélie** merci pour votre soutien sincèrement. J'espère qu'on se verra plus.

À **Vincent**, je ne t'oublie pas...

... « Les grands Hommes ne naissent pas dans la grandeur, ils grandissent ».

Merci sincèrement à vous tous.

Place à la science...

Résumé

Les changements globaux ont en partie pour effet de modifier les aires de répartition géographique des espèces. Les interactions nouvelles entre espèces n'ayant jamais été en contact peuvent potentiellement mener à des cas atypiques de reproduction, notamment l'hybridation. Ce phénomène peut avoir des implications épidémiologiques fortes car il peut conduire à la genèse de pathogènes hybrides. La combinaison du matériel génétique d'espèces distinctes peut conférer de meilleures capacités à la progéniture (vigueur hybride ou hétérosis), pouvant à terme potentiellement mener à des changements adaptatifs et à l'émergence de pathogènes dans des zones non endémiques, ce qui en fait une menace émergente à l'échelle mondiale. Ce travail de thèse se focalise sur la schistosomiase, seconde maladie parasitaire humaine et sa récente émergence en Europe (Corse, France). Après l'identification et la caractérisation génomique d'un parasite hybride entre deux agents distincts de la maladie, *S. haematobium* chez l'homme et *S. bovis* chez les bovins, nous avons mené une approche intégrative afin de caractériser à plusieurs échelles les capacités invasives et la virulence de tels parasites. À partir de souches du terrain, nous avons mis en place un protocole d'évolution expérimentale visant à générer des hybrides de première et deuxième générations au laboratoire. Nous avons analysé les modifications de traits d'histoire de vie de ces parasites ainsi que les conséquences moléculaires (génomique et transcriptomique) de ce « clash génomique » et nous montrons que l'hybridation peut être une force évolutive majeure pour les parasites.

Mots clés : Schistosomiase, Hybridation, Évolution expérimentale, Vigueur hybride, Génomique, Transcriptomique.

Abstract

Global changes contribute in modifying species geographical distribution. New interactions between species that have never been in contact before can potentially lead to atypical cases of reproduction, including hybridization. This phenomenon can have strong epidemiological consequences as it can potentially lead to the genesis of hybrid pathogens. The combination of genetic material of distinct species can confer increased capacities to the offspring (hybrid vigor or heterosis), eventually leading to adaptive changes and the emergence of pathogens in non-endemic areas, making them an emerging global threat. This thesis work focuses on schistosomiasis, the second human parasitic disease after malaria and its recent emergence in Europe (Corsica, France). After the identification and genomic characterization of a hybrid parasite between two distinct agents of the disease, *S. haematobium* in humans and *S. bovis* in cattle, we conducted an integrative approach to characterize at several scales the invasive capacities and virulence of such parasites. Starting from the field, we set up an experimental evolution protocol aimed at generating first- and second-generation hybrids in the laboratory. We analysed life history trait modifications of these parasites as well as the molecular consequences (genomics and transcriptomics) of this "genomic clash" and we show that hybridization can be a major evolutionary force for parasites.

Key words: Schistosomiasis, Hybridization, Experimental evolution, Hybrid vigour, Genomics, Transcriptomics.

Table des matières

I) La schistosomiase et ses agents infectieux à l'échelle du globe : une maladie jusqu'alors cantonnée aux régions tropicales.....	1
a) Hier, aujourd'hui et demain	1
b) Épidémiologie.....	2
c) Les agents de la maladie et leur cycle de vie complexe	4
d) Pathologie induite et stratégies de lutte contre la schistosomiase.....	7
II) La schistosomiase en Europe : cas importés vs. cas endémiques et possibilités d'introduction	10
a) Les cas importés	10
b) Les cas endémiques.....	10
III) Printemps 2013: nouvelle émergence d'un foyer de transmission en Europe : le cas Corse.....	12
a) Evènement prédit mais non anticipé	12
b) L'enquête Corse	12
c) Quels rôles et quelles conséquences de l'hybridation dans l'émergence en Corse ? ..	15
IV) Hybridation et introgression génomique : implication dans la valeur adaptative des espèces parasites	16
a) Un phénomène pas si rare : l'apport des outils moléculaires	17
b) Quels rôles pour l'hybridation	18
c) Les bases génétiques et moléculaires de la vigueur hybride.....	20
d) Hybridation chez les parasites : des organismes négligés	22
V) Hybridation au sein du genre <i>Schistosoma</i>: implication dans la valeur adaptative de la descendance	24
a) Le recensement des hybrides chez les parasites du genre <i>Schistosoma</i>	24
b) Conséquences de l'hybridation sur les traits écologiques des schistosomes.....	28
c) De l'écologie à la molécule : quelle base à la vigueur hybride chez <i>Schistosoma</i> ?	31
VI) Mise en contexte, objectifs et problématiques de la thèse.....	32

Chapitre 1 : Caractérisation du schistosome qui a émergé en Corse.....	34
1) Enquête épidémiologique et caractérisation moléculaire du parasite sur deux marqueurs (COI et ITS).....	34
2) Séquençage complet du génome de l'hybride, analyse du niveau d'introgession et caractérisation morphologique	44
Chapitre 2 : Développement de marqueurs du sexe et analyse des choix sexuels des espèces parentales <i>S. haematobium</i> et <i>S. bovis</i>.....	78
1) À la recherche de marqueurs du sexe	78
2) Choix sexuels entre <i>S. haematobium</i> et <i>S. bovis</i> et influence de l'appariement sur le transcriptome des mâles et femelles	90
Chapitre 3 : Caractéristiques des espèces parentales, modification des traits d'histoire de vie et phénotypage des lignées hybrides.....	127
1) Modification des traits d'histoire de vie des hybrides de première génération et bases transcriptomiques des changements phénotypiques	127
2) Évolution expérimentale chez <i>S. haematobium</i> x <i>S. bovis</i> et analyse de l'influence du niveau d'introgession sur les modifications des traits d'histoire de vie des parasites.....	169
Discussion générale et perspectives	200
Références.....	228

Table des figures

Figure 1 : Distribution de la schistosomiase et prévalences associées, à l'échelle du globe, 2012.....	2
Figure 2 : Cycle de vie hétéroxène des schistosomes.....	5
Figure 3: Couple de schistosomes.....	6
Figure 4 : Localisation du site d'émergence de schistosomiase en Corse du Sud, au Nord de Porto Vecchio et photographie d'un site de contamination.....	13

Figure 5 : Morphologie des œufs issus du parasite ayant émergé en Corse.....	14
Figure 6 : Représentation schématique des relations phylogénétiques entre les membres du genre <i>Schistosoma</i> et leurs principaux hôtes vertébrés.....	24
Figure 7 : Protocole d'évolution expérimentale.....	170
Figure 8 : Protocole d'évolution expérimentale (suite).....	171
Figure 9: Synthèse des traits d'histoire de vie analysés en fonction des différentes étapes du cycle de vie des schistosomes.....	173
Figure 10 : Graphique radar représentant la susceptibilité de 4 souches de mollusques à l'infection par des schistosomes purs ou hybrides.....	176
Figure 11 : Photographie des mésentères d'un hamster infecté par un hybride de première génération.....	182
Figure 12 : Représentation graphique des mesures de splénomégalie.....	186
Figure 13 : Représentation graphique des mesures de l'hépatomégalie.....	186
Figure 14 : Analyse discriminante de la morphologie des œufs issus des espèces parentales et des lignées hybrides.....	188

Encarts

Encart 1 : Des parasites aux caractéristiques sexuelles et comportements étonnants.....	6
Encart 2: Hybridation et choix sexuels entre <i>S. mansoni</i> et <i>S. bovis</i> , deux espèces responsables de la schistosomiase intestinale chez l'Homme et les bovins, respectivement.....	27

Annexes

Annexe 1.....	221
Annexe 2.....	226

Introduction

I) La schistosomiase et ses agents infectieux à l'échelle du globe : une maladie jusqu'alors cantonnée aux régions tropicales

a) Hier, aujourd'hui et demain

La schistosomiase, ou devrions-nous dire les schistosomiasés, comptent parmi les maladies tropicales négligées (NTD) d'importance médicale et vétérinaire majeures de notre époque. Toutefois il s'agit d'une maladie ancienne, connue au moins depuis l'Égypte antique. Les premières traces de cette maladie ont été identifiées chez des momies vieilles de plus de 3000 ans (Nunn & Tapp 2000; Barakat 2013). Ces momies contenaient des œufs de *Schistosoma haematobium*, agent de la bilharziose uro-génitale. Un certain nombre d'éléments présents sur d'anciens papyrus, notamment la description d'hommes présentant les symptômes principaux de la schistosomiase (hématurie, abdomen élargi et gonflé) témoignent également de la connaissance de la maladie à cette époque (Tan & Ahana 2007). C'est au début des années 1850 au Caire (Égypte) que la maladie est réellement découverte mais surtout décrite par un scientifique allemand du nom de Theodor Maximilian Bilharz (Bilharz 1853). Il donnera dans un premier temps le nom de « *Distoma haematobium* » à ces petits organismes vermiformes qu'il observe pour la première fois dans le système veineux des intestins et de la vessie de certains patients (Bilharz 1853). Plus tard, au vu de la morphologie atypique des vers, le genre *Bilharzia* est créé par Meckel von Helmsback, mais c'est finalement le genre *Schistosoma* (du grec « corps divisé ») qui est officiellement adopté par la commission internationale de nomenclature zoologique. Cependant en l'honneur de son prédécesseur le terme de bilharziose est toujours couramment employé pour décrire la maladie, et les patients malades sont d'ailleurs appelés « bilharziens ». D'importants progrès ont été menés depuis, avec la découverte des hôtes du parasite (Leiper 1915), la description de son cycle de vie, et la réalisation expérimentale du cycle complet du schistosome (Brumpt 1928). Des projets visant à décrypter le génome de ces parasites sont également initiés par L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) en 1994 et ont abouti à d'importantes découvertes sur le fonctionnement du parasite. Des programmes de contrôle visant à terme à éliminer la maladie sont également menés par l'OMS depuis près de 40 ans notamment à l'aide de traitements de masse par chimiothérapie (Fenwick & Jourdan 2015). Ce moyen de

lutte, comme son nom l'indique, consiste à traiter tous les membres d'une collectivité. Dans le cas de la schistosomiase le traitement se focalise principalement sur les écoliers. Cependant, malgré toutes ces initiatives, la maladie reste présente dans de nombreuses zones du globe. Les problématiques liées à son contrôle se sont complexifiées en partie à cause des grands enjeux auxquels nous devons faire face aujourd'hui: les changements globaux. C'est maintenant en considérant ces problématiques nouvelles que les instances de santé et les scientifiques doivent tenter d'anticiper les conditions futures de cette maladie.

b) Épidémiologie

La schistosomiase est actuellement endémique dans 78 pays des régions tropicales et subtropicales, principalement en Afrique (85%) et dans la péninsule Arabique (**Figure 1**) (Engels et al. 2002).

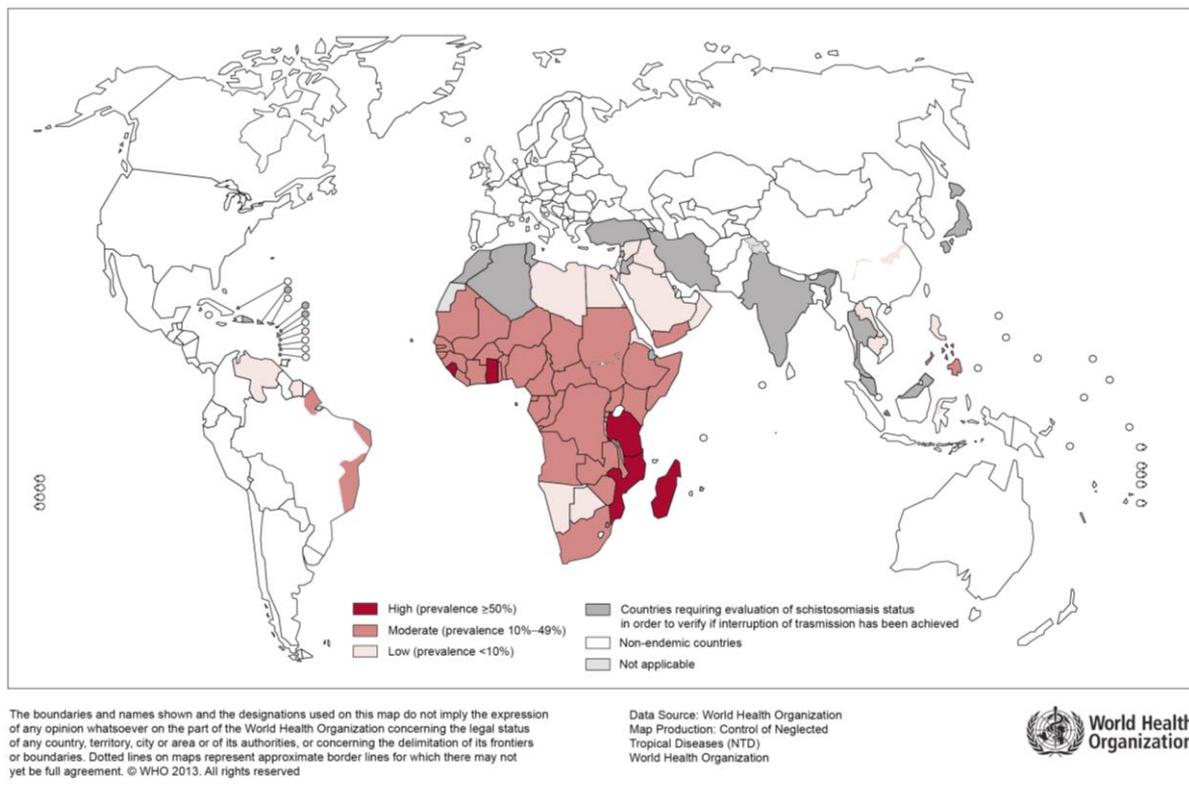


Figure 1 : Distribution de la schistosomiase et prévalences associées, à l'échelle du globe, 2012 (source : OMS, http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Schistosomiasis_2012.png)

De façon tout à fait inattendue, nous allons le voir plus en détails, cette maladie s'est récemment étendue vers les latitudes Nord, en Europe. Un foyer actif est présent en Corse et implique des parasites hybrides entre deux espèces de schistosomes (*S. haematobium* et

S. bovis) (Boissier et al. 2015) alors que le dernier foyer endémique européen date des années 1968 au Portugal (Davis & Bailey 1969; De Azevedo et al. 1948).

Les données épidémiologiques associées à la schistosomiase sont impressionnantes, et placent cette parasitose à la seconde position des maladies parasitaires humaines après le paludisme en termes de morbidité et mortalité. Près de 800 millions de personnes vivent dans des zones à risques de contamination, on déplore plus de 250 millions de personnes infectées à l'échelle du globe et plus de 200 000 décès par an (Gryseels et al. 2006; Chitsulo et al. 2000; King 2010; Engels et al. 2002). Les personnes les plus exposées sont les populations pauvres vivant dans des zones rurales ou urbaines et périurbaines défavorisées. Cette parasitose est strictement liée au contact à l'eau des populations humaines qui dans certaines régions du globe ne peut pas être maîtrisé. D'ailleurs ce sont les grandes politiques d'irrigation mises en place dans diverses régions du globe qui ont pour beaucoup entraîné l'apparition de l'infection dans des régions où elle n'existait pas avant. Les populations touchées ont généralement un accès limité à l'eau potable et ne disposent pas de services d'assainissement adéquats (Hotez et al. 2009; Hotez et al. 2007). Au sein de ces classes sociales les jeunes et en particulier les enfants sont les plus vulnérables et présentent les intensités parasitaires les plus élevées, ce qui favorise le développement d'une pathologie chronique avec des conséquences physiologiques et développementales sévères dès l'adolescence (Stothard et al. 2013; Crompton 2006). Le fardeau attribué à la schistosomiase en matière de morbidité globale, exprimé par le nombre d'années considérées comme perdues à cause de la maladie (Disability Adjusted Life Years; DALY) est d'environ 3,5 millions (Hotez et al. 2014; Abajobir et al. 2017). De plus, cette parasitose induit de fortes répercussions socio-économiques dans les pays en voie de développement et constitue une menace réelle pour les visiteurs et les voyageurs qui se rendent dans les régions endémiques. De façon assez surprenante malgré sa place en haut du classement des maladies les plus répandues, elle reste encore trop méconnue du grand public. Pourtant la prophylaxie et la sensibilisation sont de rigueur pour lutter contre cette maladie qui se heurte aux impératifs de la vie quotidienne des populations des pays en voie de développement.

c) Les agents de la maladie et leur cycle de vie complexe

Les agents responsables de la maladie sont les schistosomes, des vers plats (plathelminthes) du genre *Schistosoma*. Les vers adultes sont aussi maladroitement appelés douves du sang car ils vivent au sein des vaisseaux sanguins qui entourent les intestins ou la vessie (en fonction des espèces) de leurs hôtes définitifs mammifères. Ce tropisme va donner lieu à deux formes principales de la maladie ; la schistosomiase intestinale ou la schistosomiase urogénitale. On compte 23 espèces reconnues de schistosomes dont certaines sont spécifiques à l'Homme, d'autres aux animaux, puis des espèces qui ont la capacité d'infecter les deux types d'hôtes (espèces zoonotiques). Parmi les 6 espèces parasitant l'Homme, la plus fréquente est *S. haematobium* l'unique espèce de schistosome vivant dans les capillaires du plexus péri-vésical et qui est l'agent de la forme urogénitale de la maladie. *S. haematobium* sévit dans 53 pays d'Afrique et de la péninsule Arabique et touche près de 130 millions de personnes (Chitsulo et al. 2000; Engels et al. 2002). La deuxième espèce la plus fréquente parasitant l'Homme est *S. mansoni*, responsable de la forme intestinale ou méésentérique de la maladie. Les autres espèces provoquant la maladie chez l'Homme sont *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. guineensis*, et *S. mekongi* qui sont tous responsables de la forme méésentérique ou rectale de la pathologie (Colley et al. 2014). Les espèces de schistosomes d'importance vétérinaire majeure sont *S. mattheei*, *S. bovis*, *S. curassoni*, *S. spindale*, *S. indicum*, *S. nasale*, *S. incognitum*, et *S. japonicum* qui sont des parasites vivant dans les veines méésentériques de ruminants (bovins, ovins, caprins, porcins, équidés dromadaires, et dans certains cas des rongeurs, (Pitchford 1977). *S. bovis* est présent dans toute l'Afrique, et le Moyen-Orient, mais aussi est historiquement dans les îles méditerranéennes et en Espagne (Moné et al. 1999). On estime que plus de 165 millions de bovins d'élevage sont infectés par *S. bovis* (De Bont & Vercruyssen 1997). La capacité de certains schistosomes à être zoonotiques (*S. japonicum*, *S. mekongi* ; *S. mansoni*) et donc d'infecter à la fois des Hommes et des animaux sauvages et domestiques rend d'autant plus difficile le contrôle de la maladie car certains animaux peuvent devenir des réservoirs.

Afin d'accomplir leur cycle de vie, les schistosomes doivent infecter deux hôtes obligatoires de façon successive (**Figure 2**) ; un hôte définitif vertébré qui est l'Homme ou un autre mammifère, et un hôte intermédiaire qui est un mollusque d'eau douce de la famille des *Planorbidae* (sous-famille : *Bulininae* et *Planorbinae*), et dont le genre est spécifique à

l'espèce de schistosome. Ces parasites alternent donc entre phases libres et phases parasitaires, et sont donc confrontés à une suite de facteurs biotiques et abiotiques auxquels ils doivent être bien adaptés. Les schistosomes dépendent d'un petit nombre de genres de mollusques pour leur transmission, et la spécificité de cette interaction est en premier lieu responsable de la distribution géographique de la schistosomiase. Ceci est un élément fondamental à considérer dans le cadre de la dispersion du parasite dans de nouveaux environnements. Les mollusques hôtes majeurs dans la transmission de schistosomiase sont du genre *Bulinus*, *Biomphalaria*, ou *Indoplanorbis*.

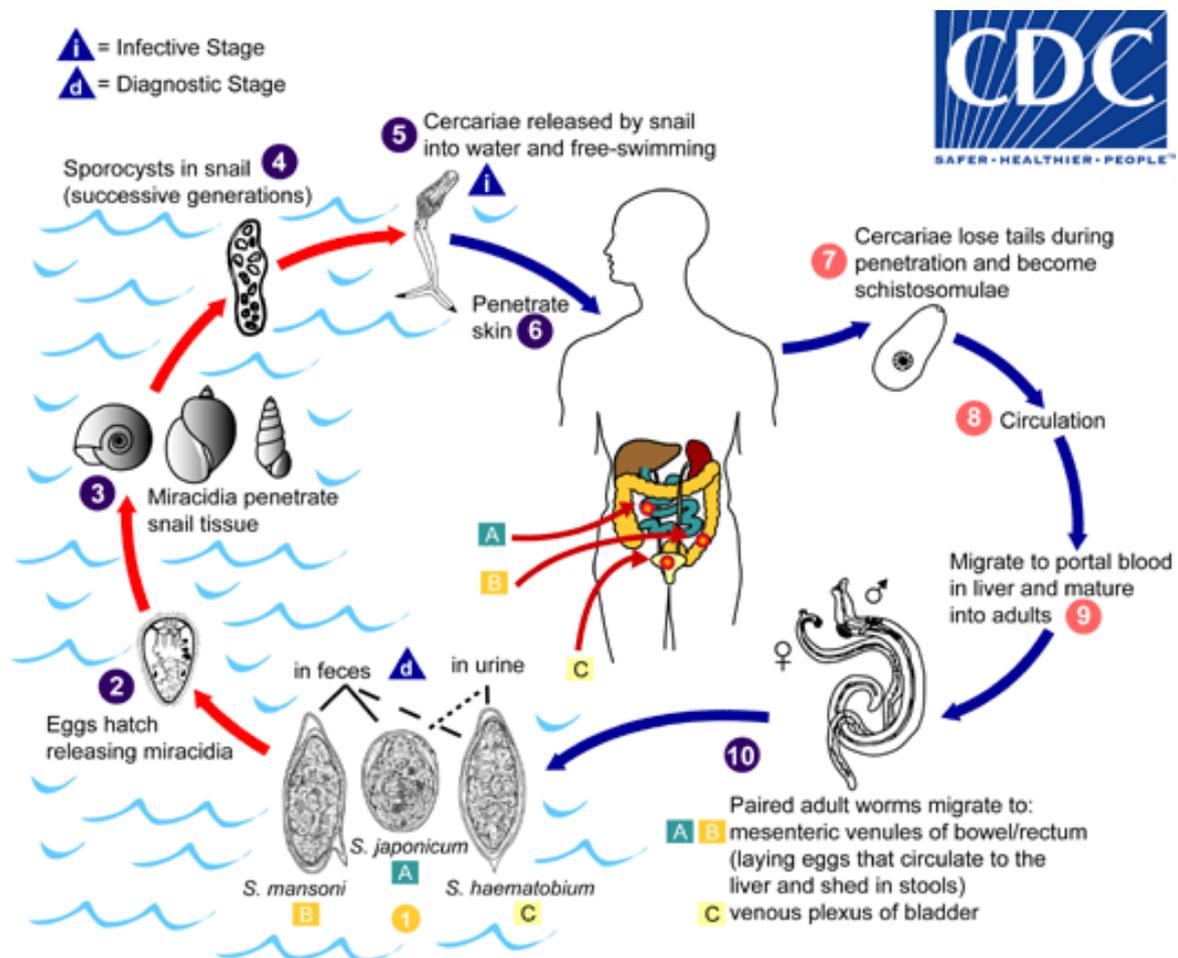


Figure 2 : Cycle de vie hétéroxyène des schistosomes. 1) Les œufs sont excrétés dans le milieu externe via les *féces* ou l'urine en fonction de l'espèce de *Schistosoma* concernée, 2) éclosion des larves ciliées nageuses *miracidia*, 3) pénétration active des *miracidia* dans les mollusques hôtes intermédiaires, 4) stade intra-mollusque du parasite avec multiplication clonale en sporocystes primaires et secondaires, 5) émission des cercaires, larves infectantes pour les hôtes définitifs vertébrés dans l'eau douce, 6) pénétration transcutanée des cercaires chez l'hôte définitif, représenté ici par un humain. 7-10) développement et migration du parasite chez les hôtes définitifs, jusqu'à la formation de couples monogames de vers adultes produisant des œufs embryonnés (Source : CDC Center for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>)

L'infection a lieu lorsque l'hôte définitif entre en contact avec une eau douce contaminée par les larves du parasite (cercaires) qui sont émises par le mollusque vecteur. Ces larves libres pénètrent à travers l'épiderme de l'hôte, perdent leur queue pour devenir des schistosomules et se développent à travers une longue migration en passant par le cœur et les poumons, puis se retrouvent au niveau de la veine porte-hépatique où des couples monogames se forment environ deux semaines après l'infestation. Ces couples en plus d'avoir la particularité de présenter des sexes séparés, ont des caractéristiques sexuelles et comportementales étonnantes (**Encart 1, Figure 3**) et vont migrer vers les lieux de ponte (spécifiques aux espèces méésentérique ou urogénitale).

Encart 1 : Des parasites aux caractéristiques sexuelles et comportements étonnants

Les schistosomes adultes sont des parasites aux caractéristiques et comportements sexuels des plus étonnants. Premièrement ce sont des organismes à **sexes séparés**. **Claude Combes a qualifié cela de « scandale évolutif »** au sein des Trématodes qui sont majoritairement hermaphrodites (Combes 1991). Des couples **monogames** (Tchuem Tchuente et al. 1996; Beltran & Boissier 2008) sont systématiquement formés lorsque les vers trouvent un partenaire. En plus de cette « relation de couple » les vers vivent étroitement liés d'un point de vue comportemental mais aussi physiologique (Moné & Boissier 2004). Cette **interdépendance** est en lien avec un **dimorphisme sexuel marqué** et un **rôle complémentaire** des sexes, qualifié de "partage des tâches ménagères" (Basch 1990; Loker & Brant 2006). Le **mâle musculéux** dispose d'un **canal gynécophore** et d'une grosse **ventouse ventrale** lui permettant de résister au flux sanguin. La **femelle fine et effilée** est portée par le mâle au sein de cette structure et a la capacité de déposer ses œufs au plus près de la lumière de l'organe afin d'optimiser la transmission du parasite dans l'environnement. Au niveau physiologique la femelle est dépendante du mâle pour son transport, sa nutrition, mais aussi de façon importante sa maturation sexuelle (Popiel 1986; Popiel et al. 1984). Le fort investissement paternel expliquerait le système d'appariement de type monogame chez les schistosomes (Beltran & Boissier 2008).



Figure 3: Couple de schistosomes. On aperçoit la femelle dans le canal gynécophore du mâle musculéux (échelle = 100 µm). Photo de Daniele Establet (Beltran and Boissier 2008).

Les femelles, à partir de cinq semaines chez *S. mansoni* et huit semaines chez *S. haematobium*, libèreront des centaines d'œufs par jour au niveau de fins vaisseaux sanguins débouchant sur la lumière de l'intestin ou de la vessie. Les œufs sont pourvus d'un éperon, dont la localisation est caractéristique du clade (ou groupe) de *Schistosoma*, voire de l'espèce en question (*i.e.* terminal pour le clade *haematobium* et latéral pour le clade *mansoni*) et permettra aux œufs de traverser les vaisseaux sanguins et de gagner le milieu extérieur via l'urine ou les fèces de l'hôte. Si les œufs rentrent en contact avec un milieu d'eau douce, ils pourront éclore pour libérer un autre stade larvaire libre (*miracidia*) qui pourra activement chercher un mollusque hôte intermédiaire. Après pénétration et multiplication clonale au sein du mollusque par une succession de deux phases mitotiques (sporocystes primaires puis secondaires), des centaines de larves infectantes pour les vertébrés (cercaires) seront émises durant le reste de la vie du mollusque hôte intermédiaire (ou vecteur). La phase d'émission cercarienne, c'est-à-dire le moment de la journée où sont émises du mollusque les cercaires est une composante essentielle à la transmission du parasite et a co-évolué de façon à coïncider avec les comportements aquatiques des hôtes définitifs de prédilection de l'espèce de *Schistosoma* concernée (Théron 2015).

d) Pathologie induite et stratégies de lutte contre la schistosomiase

La chronicité de l'infection, l'augmentation des charges parasitaires après chaque contact à l'eau et la longévité importante des schistosomes (de 3 à 5 ans en moyenne mais peut atteindre 30 ans) chez l'hôte définitif (Gryseels et al. 2006) sont autant de facteurs responsables de l'aggravation de la maladie et de la manifestation des symptômes. En revanche il faut noter que chez certains patients, notamment les voyageurs et baigneurs occasionnels en zones endémiques, la maladie est souvent asymptomatique. Cette absence de symptômes est en partie liée à des infections unisexuées, et donc à l'absence d'œufs de schistosomes chez l'hôte ou à des charges parasitaires faibles (Lu et al. 2018). Lorsque les symptômes sont perceptibles ils sont caractérisés par deux phases distinctes, une phase aiguë due à la pénétration/colonisation du parasite dans l'hôte et une phase chronique évoluant sur plusieurs années, principalement due à la forte prolificité des schistosomes (Gryseels 2012). Dans un premier temps les patients peuvent présenter des lésions cutanées dues à la pénétration des cercaires (dermatite), puis une réaction immunopathologique caractéristique appelée syndrome de Katayama (Fièvre, toux, céphalées) (Doherty et al.

1996). La phase chronique et la pathologie induite sont principalement liées à l'oviparité des schistosomes, l'accumulation massive des œufs dans différents tissus et organes de l'hôte et la formation de masses granulomateuses par l'hôte pour les piéger. Le nombre d'œufs produits par les femelles schistosomes est important, de l'ordre de 100 à 3000 œufs par jour en fonction de l'espèce (Cheever et al. 1994). On estime que seulement 50% des œufs produits par le parasite gagneront le milieu extérieur et participeront au cycle de vie des schistosomes. C'est donc cette contre-performance du parasite qui est responsable du lourd fardeau attribué à la schistosomiase. De façon générale c'est le foie qui est le principal organe touché à cause de son rôle clé dans la filtration du sang puisqu'il va accumuler les œufs perdus dans le système sanguin. Au stade chronique cela peut se manifester par une hépato-splénomégalie, des douleurs abdominales et une accumulation de liquide dans la cavité péritonéale ainsi que la présence de sang dans les selles pour la bilharziose intestinale. La forme urogénitale de la pathologie est quant à elle principalement caractérisée par une hématurie et se traduit souvent par des complications au niveau de la vessie et de l'urètre. À terme, la schistosomiase urogénitale peut provoquer des lésions rénales et la stérilité (Kjetland et al. 2016; van Delft et al. 2007). Cependant les deux formes de cette maladie induisent à long terme des complications menant à des fibroses (notamment hépatique, et de la vessie), des cirrhoses, des cancers (foie, de la vessie ou d'autres organes), puis la mort. Il est également important de noter que la schistosomiase est un facteur à risque de contacter d'autres maladies infectieuses et notamment le VIH (Feldmeier et al. 1994).

Malgré la connaissance de longue date de la maladie, les études scientifiques sur la schistosomiase commencent tardivement ce qui a impacté la mise en place de moyens de lutte efficace contre la maladie (Sturrock 2001). Ceux-ci commencent à la fin de la seconde guerre mondiale suite à la création de l'OMS. Dans un premier temps, en absence de traitement chez l'Homme c'est le compartiment mollusque qui est ciblé par les instances de santé notamment avec l'utilisation de molluscicides. L'utilisation de molluscicides s'avère relativement efficace, mais représente un coût financier important pour les pays ciblés compte tenu de son étendue d'action spatiale et temporelle. De plus les répercussions environnementales dues à l'utilisation de tels produits est légitimement contestable. Un des objectifs premiers pour lutter contre la schistosomiase était l'élaboration d'un vaccin qui a

malheureusement échoué jusqu'ici mais pour lequel les études sur certains candidats continuent (Wilson & Coulson 2006; Tebeje et al. 2016; McManus & Loukas 2008). Depuis les années 1980, l'OMS a mis en place des programmes de contrôle avec pour objectif à terme l'élimination de la schistosomiase. Ces programmes s'appuient sur le traitement de masse par chimiothérapie à l'aide d'un anthelminthique commercialisé sous le nom de Biltricide (la molécule active étant le Praziquantel) (Hotez et al. 2009; Fenwick & Jourdan 2015; Colley et al. 2014; Crompton 2006; Cioli et al. 2014). Malheureusement le traitement de masse ne cible pas toutes les catégories de la population concernées. En 2016 on estime que sur les 206 millions de personnes nécessitant un traitement 89 millions ont bénéficié d'un traitement préventif par chimiothérapie (WHO 2017). Actuellement la méthode employée consiste à traiter massivement les écoliers en zone endémique avec 40 mg/kg de poids corporel de Praziquantel. Il faut savoir que le traitement est également efficace chez les animaux (Johansen et al. 1996; Monrad et al. 2006), mais la priorité reste bien évidemment le traitement des populations humaines. Quoi qu'il en soit le Praziquantel est aujourd'hui le seul traitement efficace présentant peu d'effets secondaires et disponible à un moindre coût. Différents programmes de contrôle de la schistosomiase se sont montrés faisables et efficaces notamment en Égypte, au Japon, aux Philippines, ou encore en Chine et au Brésil où la maladie a réussi à être enrayerée (Rollinson et al. 2013). Cependant, ce type d'approche se focalise principalement sur l'hôte définitif vertébré humain et non les hôtes réservoirs potentiels de la maladie. Le Praziquantel est sûr, bon marché et efficace contre les vers adultes. Les taux de guérison atteignent 85 à 90%. En revanche il présente l'inconvénient d'être inefficace sur les stades précoces du parasite (schistosomules) et ne protège pas sur le long terme. De plus, du fait de l'utilisation d'un seul traitement, des cas de résistance au Praziquantel sont à craindre (King et al. 2000; Kusel & Hagan 1999; Bennett et al. 1997).

La schistosomiase est une maladie multifactorielle et par voie de conséquence elle est difficile à contrôler en zones endémiques à cause du cycle de vie complexe (hétéroxène) des schistosomes, leur spectre d'hôte, et les activités aquatiques de ses hôtes. Afin de contrôler durablement la transmission du parasite nous devons considérer l'ensemble de ces facteurs en combinant sensibilisation et traitements préventifs des populations humaines, mais également considérer les hôtes animaux et les mollusques vecteurs. En plus de ces

problématiques, l'anthropisation, les flux de populations humaines, la mondialisation, le transport, les changements climatiques avec les conséquences de ces modifications sur les espèces pathogènes elles-mêmes et leur distribution sont autant de facteurs supplémentaires qui pourraient impacter le contrôle de la schistosomiase et des maladies infectieuses en général.

II) La schistosomiase en Europe : cas importés vs. cas endémiques et possibilités d'introduction

a) Les cas importés

Les cas de schistosomiase humaine en Europe sont rares et sont généralement diagnostiqués chez des voyageurs européens ayant été infectés en zone endémique (Grobusch et al. 1999; Gautret et al. 2012). Selon une étude sentinelle menée par le réseau européen de médecine tropicale et de santé des voyageurs (European Network for Tropical Medicine and Travel Health) sur l'importation de la schistosomiase entre 1997 et 2010, il y aurait eu 1 465 cas importés soit i) par des voyageurs Européens (33%), ii) des expatriés de longue date (16%), mais aussi, iii) par des migrants non européens (51%). La majorité des infections sont contractées en Afrique et plus de la moitié des patients ne présentaient pas de symptômes (Lingscheid et al. 2017). Une autre étude menée par le consortium EuroTravNet (European Travel Medicine Network) entre 2008–2012 sur plus de 32 000 voyageurs montre des résultats similaires avec les cas de schistosomiase importés à la 12^{ème} place des maladies introduites en Europe toutes catégories de voyageurs confondues (Schlagenhauf et al. 2015). En France plus de 2 000 cas de schistosomiase importés sont diagnostiqués chaque année. Ainsi de nombreuses personnes infectées et ne présentant pas de symptômes particuliers de la maladie rentrent chaque année sur le continent européen avec le risque potentiel d'importer et de disperser les parasites dans ce nouvel environnement.

b) Les cas endémiques

Des cas endémiques de schistosomiase urogénitale ont déjà été identifiés en Europe et notamment au Portugal dans les années 1921 (De Azevedo et al. 1948). Le dernier cas fut diagnostiqué en 1960, puis le foyer fut déclaré éradiqué en 1967 (Davis & Bailey 1969). Dans ce contexte, l'hôte intermédiaire naturel présumé était *Planorbarius metidjensis*, l'hôte

naturel de *S. bovis*. Notons que cet hôte est inhabituel pour l'agent de la schistosomiase urogénitale à *S. haematobium*. D'ailleurs plusieurs hypothèses sont proposées, mais en l'absence de méthodes moléculaires à l'époque il ne s'agit que de spéculations. La première est que le parasite était capable d'infester naturellement *P. metidjensis* comme c'était le cas pour une souche de *S. haematobium* originaire du Maroc à l'époque où le parasite y était encore présent (Yacoubi et al. 2007; Zekhnini et al. 2002; Yacoubi et al. 1999). Une autre possibilité est que le changement d'environnement, et l'absence d'hôtes adéquats ont favorisé un élargissement du spectre d'hôte et un transfert sur un hôte non spécifique mais relativement proche de *Bulinus (Planorbidae)*. Pour finir il est possible que le parasite fût un hybride entre l'agent urogénital et une autre espèce pouvant naturellement infecter *P. metidjensis*, comme c'est le cas pour *S. bovis*. Suite à cet épisode aucun foyer infectieux donnant naissance à des cas endémiques de schistosomiase humaine n'a été prouvé. En revanche un cas suspect a été identifié, avec un patient espagnol porteur de la schistosomiase urogénitale et n'ayant jamais séjourné en zone endémique mais en république dominicaine et au Portugal (Calvo-Cano et al. 2015).

En revanche, la transmission de schistosomiase animale causée par *S. bovis* est plus fréquente en Europe. Historiquement *S. bovis* est présent dans les îles méditerranéennes (Moné et al. 1999). Il a été identifiée en Corse (Brumpt 1930), en Sardaigne (Sadun 1962), mais aussi en Espagne (Silva et al. 1977), et au Portugal (Ramajo Martín 1972). La dernière étude portant sur la transmission de *S. bovis* date de 1962 (Gretillat 1963). Toutefois il n'existe actuellement pas de données épidémiologiques permettant d'évaluer la transmission de *S. bovis* en Europe. Quoi qu'il en soit les mollusques nécessaires à la transmission du parasite sont présents en Europe. Les changements globaux, pourraient induire dans le futur un élargissement des zones de distributions des mollusques en particulier vers le Nord et augmenteraient donc la distribution théorique des parasites. Ces parasites peuvent être introduits en Europe notamment par l'intensification des flux de personnes entre les zones endémiques et les zones à risque.

Nous discuterons de l'évaluation des risques d'introduction et d'endémicité de la schistosomiase en Europe à la fin de cette thèse, notamment dans la discussion à travers un article d'opinion qui s'appuie sur la présence concomitante du parasite et de ses hôtes, vue à travers un filtre de rencontre, et du potentiel d'interaction entre les deux protagonistes, vue

cette fois à travers un filtre de compatibilité en hommage à Louis Euzet et Claude Combes (Kincaid-Smith et al. 2017).

III) Printemps 2013: nouvelle émergence d'un foyer de transmission en Europe : le cas Corse

a) Evènement prédit mais non anticipé

Il y a cinquante ans déjà, un parasitologue français soulignait que l'ensemble des conditions nécessaires à l'établissement de transmission de schistosomiase étaient réunies en Corse et que « le premier cas certain de bilharziose humaine autochtone n'est donc pas inconcevable... » (Doby et al. 1966). Environ 50 ans plus tard le parasite a pu s'établir, provoquant des cas autochtones de schistosomiase urogénitale en Corse du sud. Les premiers cas ont été diagnostiqués en avril 2014 chez des patients français et allemands n'ayant jamais séjourné dans des zones endémiques de la schistosomiase mais ayant tous été en contact avec la rivière du Cavu entre 2011 et 2013, à proximité de Porto-Vecchio (**Figure 4**) (Holtfreter et al. 2014; Berry et al. 2016; Berry et al. 2014; Boissier et al. 2015). C'est dans ce contexte que l'enquête épidémiologique sur les cas potentiellement acquis en Corse a commencé.

b) L'enquête Corse

De nombreux acteurs se sont réunis afin de comprendre cette situation inédite dans cette partie du globe. Une vaste campagne nationale de dépistage, de traitement et d'information a été lancée, et en 2015 l'INstitut de Veille Sanitaire (INVS, aujourd'hui Santé Publique France) ainsi que le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) ont recensé une centaine de cas d'infections en Corse (37 000 personnes diagnostiquées), autochtones mais également de personnes résidant en France métropolitaine et à l'étranger montrant l'étendue du foyer infectieux (Noël et al. 2018). Des investigations épidémiologiques, parasitologiques et malacologiques ont permis d'identifier précisément les sites de transmission et les périodes d'infection, mais aussi de confirmer la présence de l'hôte intermédiaire (*Bulinus truncatus*) nécessaire à la transmission du parasite (**Figure 4**) (Boissier et al. 2015). La présence de l'hôte intermédiaire en Corse était connue depuis de nombreuses années (Brumpt 1930) mais le risque potentiel de voir ce mollusque devenir le

vecteur de la schistosomiase sous nos latitudes a échappé aux instances de santé. Le parasite a forcément été importé par une personne infectée, qui a disséminé, malgré elle, les œufs de parasites dans la rivière. En effet, la Corse est particulièrement attractive pour les touristes et sa population s'élève de 300 000 à 3 millions de personnes en saison estivale, faisant autant d'hôtes potentiels pour le parasite, mais également autant d'hôtes réservoirs de la maladie.



Figure 4 : Localisation du site d'émergence de schistosomiase en Corse du Sud, au Nord de Porto Vecchio et photographie d'un site de contamination. Il est également représenté sur cette figure la présence de bulins (hôtes vecteurs du parasite) ainsi que les panneaux interdisant la baignade en 2014. (Crédit photo © Boissier-IHPE-2015).

La rivière du Cavu fut interdite à la baignade pour la saison 2014 (**Figure 4**). Aucun cas n'a été recensé après cette fermeture. La réouverture en 2015, et l'identification de nouveaux cas contractés durant cette période, mais également la saison suivante en 2016 (au total 7 nouveaux cas) ont mis en évidence une reprise de la transmission (Ramalli et al. 2018; Berry et al. 2016). Le réservoir vertébré et notamment humain est le premier suspect dans le réensemencement de la rivière dans les années qui ont suivi les premiers cas (Berry et al. 2016). En juin 2016, la schistosomiase est devenue une maladie à déclaration obligatoire, centralisée par un même institut et permettant de recenser l'ensemble des cas contractés sur le territoire français. La déclaration doit être faite auprès du médecin de l'Agence régionale de santé (ARS) du lieu d'exercice et à Santé Publique France (SPF). Aujourd'hui la schistosomiase peut être considérée comme endémique en Corse. Concernant l'année 2017

il n'y a pas eu à ce jour de cas identifiés de contamination mais la détection des personnes infectées est difficile: 66% des personnes infectées lors de l'épidémie de 2013 étaient asymptomatiques et le délai médian avant l'apparition du premier symptôme est de 7 mois (Ramalli et al. 2018).

Afin de mieux comprendre et contrôler la situation épidémiologique en Corse il était nécessaire de caractériser la nature du parasite responsable de l'épidémie à la fois au niveau de ses interactions avec ses hôtes potentiels mais aussi au niveau moléculaire. Lorsqu'un foyer de schistosomiase est décrit il est nécessaire d'identifier/confirmer l'espèce de parasite incriminée. L'enquête parasitologique de la schistosomiase est dans un premier temps basée sur la morphologie des œufs, typique d'une espèce ou groupe d'espèces de schistosomes (**Figure 5**). Les œufs récupérés à partir de l'urine des patients contaminés durant l'infection en 2013 avaient deux morphotypes, i) un morphotype rond à ovale, typique de *S. haematobium*, ii) un morphotype intermédiaire entre ovale et allongé/losangique non typique de *S. haematobium* (Moné et al. 2015) (**Figure 5**).



Figure 5 : Morphologie des œufs issus du parasite ayant émergé en Corse. Deux morphotypes d'œufs ont été observés: à gauche, deux œufs au morphotype non typique de *S. haematobium*; à droite, un œuf typique de *S. haematobium* (adapté de (Moné et al. 2015)).

La caractérisation moléculaire des œufs issus de patients infectés a également indiqué une situation complexe avec, en plus d'une contamination par l'espèce pure *S. haematobium*, la présence d'un parasite hybride entre *S. haematobium* et *S. bovis* qui est l'agent de la schistosomiase intestinale chez le bétail (Moné et al. 2015; Boissier et al. 2016). Nous verrons plus en détails la caractérisation du parasite dans le **Chapitre 1 : Caractérisation du Schistosome émergent en Corse**, en nous appuyant sur deux de nos publications. Une première publication nous a permis d'élucider l'origine de l'émergence et de caractériser le statut hybride du parasite grâce notamment à des marqueurs moléculaires représentatifs du génome mitochondrial (COI : cytochrome oxydase I) et nucléaire (ITS2 : espaceur interne transcrit 2) du parasite (Boissier et al. 2016). La seconde publication a permis de caractériser

la composition génomique du parasite hybride et a révélé un mélange complexe de gènes parentaux des deux espèces à l'échelle du génome entier.

c) Quels rôles et quelles conséquences de l'hybridation dans l'émergence en Corse ?

Le caractère hybride du schistosome identifié en Corse rend la situation épidémiologique bien plus complexe et nécessite de prendre en compte les facteurs liés aux traits de vie des deux espèces parasites. Comme nous avons pu le voir dans les parties précédentes, la schistosomiase est déjà une maladie difficilement contrôlable en partie à cause des multiples facteurs impliqués dans sa transmission. L'hybridation peut donc potentiellement conférer un nouveau facteur important à considérer dans le contrôle de la maladie car elle peut être à l'origine d'une capacité invasive supérieure. Nous ne savons pas encore si l'origine hybride du parasite est responsable de son expansion en Europe. En réalité nous connaissons déjà très peu les caractéristiques de ces parasites hybrides en Afrique et faisons face à une situation inédite en Europe. Nous ne connaissons pas les traits d'histoire de vie des schistosomes sous nos latitudes, et encore moins hybrides. Nous pouvons d'une part proposer que les hybrides pourraient être moins viables que les espèces parentales. Dans ce cas il y a peu de chances que l'hybridation soit à l'origine de l'émergence de la schistosomiase en Europe. En revanche ces croisements d'espèces peuvent dans certains cas conférer des capacités supérieures à la descendance comparé aux espèces parentales. En effet, le parasite peut être plus virulent et son spectre d'hôte peut être modifié ce qui impacterait fortement la transmission du parasite. Ils peuvent également bénéficier d'une meilleure capacité d'adaptation à un nouvel environnement. Dans ce cas là les hybrides peuvent avoir des capacités invasives plus importantes et ceci pourrait expliquer l'origine de l'émergence d'un tel parasite tropical en Europe. Afin d'explorer les conséquences de l'hybridation sur la valeur adaptative des parasites il est nécessaire de comparer ces hybrides aux espèces parentales à l'origine de ces croisements.

IV) Hybridation et introgression génomique : implication dans la valeur adaptative des espèces parasites

Depuis toujours l'Homme a tenté de catégoriser le monde du vivant dans l'optique de mieux le comprendre. L'unité d'étude de base pour de nombreux biologistes est « l'espèce ». La définition la plus communément admise même si elle reste largement controversée correspond au concept de l'espèce biologique défini par Ernst Mayr (Mayr 1963; Mayr 1942). Selon cette définition les espèces sont considérées comme des «Groupes de populations naturelles qui se croisent ou peuvent potentiellement se croiser pour donner une descendance viable et féconde et qui sont isolées les unes des autres par la reproduction». Cependant, le concept d'espèce biologique est souvent remis en cause (Aldhebiani 2018; De Queiroz 2007) par la mise en évidence de flux de gènes entre espèces (Mallet 2005; Mallet 2008; Baack & Rieseberg 2007). Il semble donc important de définir cette notion d'espèce avant de présenter l'hybridation dans la mesure où la définition de ce dernier phénomène est directement dépendante de la définition qu'on l'on donne à l'espèce.

L'**hybridation** correspond à la rencontre et au croisement entre deux entités génétiques distinctes définies précédemment comme des espèces différentes, c'est-à-dire normalement isolées sur le plan reproducteur. Ce phénomène va donc à l'encontre même du concept d'espèce biologique. La reproduction sexuée entre les individus d'espèces différentes va conduire à la combinaison de matériel génétique issu de pools de gènes précédemment isolés au sein d'un même organisme. La reproduction entre hybrides, ou entre parents et hybrides va conduire à ce que l'on appelle l'**introgression** (génomique ou génétique). Cela correspond au transfert de matériel génétique du génome d'une espèce donneuse dans le génome d'une espèce receveuse via des processus successifs de rétrocroisements. L'échange de matériel génétique peut correspondre à un gène, un locus contenant plusieurs gènes ou encore à un chromosome entier. Les descendants seront constitués d'un mélange plus ou moins complexe de gènes issus de ces espèces et peut à terme progressivement mener (si le croisement est dirigé et les génomes perméables) à une invasion généralisée d'un génome par un autre (Mallet 2005).

a) Un phénomène pas si rare : l'apport des outils moléculaires

C'est à la fin des années 1930 avec les travaux d'Anderson chez les plantes que les premières études expérimentales démontrant un échange de matériel génétique entre deux espèces (*i.e.* introgression par hybridation) ont commencé (Anderson & Hubricht 1938; Anderson 1948). L'hybridation est vue dans un premier temps comme un événement rare et en particulier chez les animaux qui a priori disposent de systèmes de reconnaissance et d'isolement reproducteur (Mayr 1963). En effet, les cas fréquents d'infertilité observés chez les descendants suggéraient que l'hybridation était un phénomène lié à une erreur dans ces mécanismes d'isolement reproducteur des espèces. Aujourd'hui, avec le développement d'outils moléculaires, et l'intégration des outils de génétique en écologie et vice et versa (écologie moléculaire) de nombreux hybrides ont été identifiés révélant que le génome de nombreux organismes était perméable aux allèles d'autres espèces (Arnold 2004; Mallet 2005; Dowling & DeMaris 1993; Johnston et al. 2012; Machado & Ayala 2001; Grant & Grant 1992; Grant & Grant 1997; Rieseberg et al. 2003; Schwenk et al. 2008; Bull et al. 2006). On estime qu'environ 25% des espèces végétales, et 10% des espèces animales auraient la capacité de s'hybrider et d'échanger du matériel génétique via l'introgression (Mallet 2005; Schwenk et al. 2008). En fonction des taxons le nombre d'hybrides observés dans la nature est plus ou moins important. Ceci suggérait dans un premier temps une aptitude intrinsèque plus forte de certains taxons comparativement à d'autres à s'hybrider. En réalité ce biais est sans doute le reflet d'un niveau d'intérêt supérieur porté aux espèces d'intérêt agricole. Cependant certains facteurs vont conditionner l'hybridation entre espèces et notamment, le temps de divergence entre celles-ci (distance phylogénétique), leur structure génomique (ploïdie et caryotype) et la perméabilité des génomes au flux de gènes. En général, les espèces ayant divergé récemment sont plus sujettes à l'hybridation car peu de zones génomiques et de gènes sont suffisamment différenciés pour limiter l'interfécondité. Cependant, les espèces ayant anciennement divergé, même si elles ne se croisent plus aujourd'hui, ont potentiellement pu échanger des gènes dans le passé (Mallet 2005; Baack & Rieseberg 2007). Des études suggèrent que les patrons d'introgression et donc la perméabilité à des allèles étrangers ne sont pas uniformes sur le génome (Bull et al. 2006; Martinsen et al. 2001). Ceci va dépendre i) du taux de recombinaison de la zone génomique concernée (moins une région recombine, moins cette région est sujette à l'introgression) et

ii) du potentiel adaptatif que peut conférer cette introgression dans un environnement donné (Turner et al. 2005; Arnold & Martin 2009; Martinsen et al. 2001). En général les hybrides de première génération (F1) sont les plus difficiles à produire mais lorsqu'ils sont viables et féconds, vont permettre le transfert génétique entre les espèces parentales en se rétrocroisant avec ces dernières. Les chromosomes sexuels ont par ailleurs un taux de recombinaison plus faible et sont souvent à l'origine d'incompatibilités entre espèces (Payseur et al. 2004; Turissini & Matute 2017; Muirhead & Presgraves 2016). En général, comme le suggère la règle d'Haldane, c'est le sexe hétérogamétique qui paye le coût de la recombinaison car il ne possède au niveau des chromosomes sexuels qu'une copie de l'allèle potentiellement délétère (Schilthuizen et al. 2011). Quoiqu'il en soit l'hybridation et l'introgression génomique peuvent avoir de grandes conséquences sur les traits d'histoire de vie des individus en fonction des parties du génome affectées.

b) Quels rôles pour l'hybridation

L'hybridation chez les plantes et les animaux est donc plus fréquente et plus complexe que ce qu'on pouvait le penser. Par définition, on pensait pendant longtemps que l'hybridation donnait naissance à une progéniture moins robuste et moins adaptée que les espèces parentales car souvent non viable ou stérile. Ces effets délétères sur les descendants (baisse de la valeur adaptative) devraient à terme être contre-sélectionnés par la mise en place de mécanismes d'isolement reproducteur limitant le flux de gènes interspécifiques. Par ces mécanismes, l'introgression devrait donc être un phénomène rare. Au contraire, si l'hybridation ne confère pas de coût, et se montre même avantageuse, les barrières à la reproduction peuvent être plus perméables, et la probabilité d'hybridation pour un couple d'espèces données plus importante. En fonction de la valeur adaptative des nouvelles combinaisons génomiques résultantes, l'hybridation peut induire des changements rapides dans la structure des génomes (ploïdie, réarrangements chromosomiques, expansion de la taille des génomes, activation des éléments transposables) (Baack et al. 2005; Ungerer et al. 2006) et dans leur fonction par la mise en place de nouveaux patrons d'expression (différentiel d'expression, inactivation de certains gènes ou allèles). En effet, on suggère que l'hybridation permettrait de générer des innovations génétiques plus rapidement que la mutation (Schwenk et al. 2008) et pourrait mener à de nouveaux patrons d'expression génomique menant à des phénotypes (moléculaire et écologique) pouvant faire concurrence

aux espèces parentales (McClintock 1984; Mallet 2005; Adams & Wendel 2005). La valeur adaptative supérieure des hybrides par rapport aux espèces parentales est connue sous le nom de « **vigueur hybride** » ou « **hétérosis** » et le transfert d'allèles favorables d'une espèce dans l'autre est connue sous le nom d'« **introgression adaptative** » à l'opposé de la notion d'introgression neutre (Hedrick 2013). La **vigueur hybride** ou **hétérosis** a été pour la première fois caractérisée de façon systématique par Charles Darwin en 1876 (Darwin 1877) mais ce phénomène est exploité pour la production et l'élevage de plantes et d'animaux depuis bien plus longtemps et est toujours largement utilisé dans le monde (Duvick 1999). Il décrit de manière générale la meilleure survie ou performance d'une descendance hybride comparée aux parents (Bar-Zvi et al. 2017; Baranwal et al. 2012; Birchler et al. 2006; Lippman & Zamir 2007; Goff 2011; Hochholdinger & Hoecker 2007). À terme l'hybridation permet de générer de nouveaux phénotypes, et permet dans certains cas à la descendance disposant de combinaisons avantageuses d'allèles parentaux, i) d'être mieux adaptée aux conditions locales, ii) d'avoir la capacité de s'adapter à de nouvelles niches écologiques (nouveaux environnements), iii) de faire face à des conditions biotiques et abiotiques changeantes et par conséquent d'être mieux adaptées aux changements climatiques (Becker et al. 2013). Cette amélioration de la valeur adaptative des hybrides comparées aux espèces parentales peut se traduire parfois par le remplacement d'une espèce par une autre (Rhymer & Simberloff 1996; Sánchez-Guillén et al. 2014). La mise en place progressive de facteurs écologiques ou génomiques (changement de niche, choix sexuels, incompatibilité génomique) via la divergence entre ces populations va mener à un isolement reproducteur entre parents et hybrides et peut finalement conduire à la spéciation, un processus appelé «**spéciation par hybridation**» (Seehausen 2004; Barton 2001; Tsai et al. 1994; Mavárez et al. 2006; Mallet 2007). Ces phénomènes ont pris une place importante dans les domaines de l'écologie, la taxonomie et la systématique. Aujourd'hui l'hybridation est toujours très étudiée par les biologistes de l'évolution, notamment afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans les processus de spéciation, sélection, recombinaison et mais aussi à des fins de conservation d'espèces (Kovach et al. 2016).

c) Les bases génétiques et moléculaires de la vigueur hybride

Les capacités améliorées des hybrides sont en partie liées à une diversité génétique accrue par rapport aux espèces parentales mais malgré de nombreuses études menées depuis plus de 100 ans les bases génétiques et moléculaires de ce phénomène restent pour l'instant mal comprises et controversées (Chen 2013; Chen 2010; Birchler 2003; Birchler et al. 2006; Hochholdinger & Hoecker 2007). En effet, aucun consensus n'a abouti et une des raisons à cela est que même si la vigueur hybride est observée chez de nombreux organismes, les bases sous-jacentes semblent relativement spécifiques en fonction du modèle étudié. Selon Barbara McClintock (McClintock 1984), l'hybridation peut être visualisée comme la rencontre de deux génomes distincts qui dans un premier temps rentrent dans une phase de turbulences avant d'atteindre un équilibre homéostatique. Cette phase de turbulence génomique appelée « choc ou clash génomique » serait à l'origine d'un relâchement génomique global dans la régulation de l'expression des gènes et l'activation d'éléments transposables, menant à terme à de nouveaux patrons d'expression génique (Ha et al. 2009). Les premières études pour décrypter les bases moléculaires de la vigueur hybride étaient d'ordre génétique. Ces études ont permis dans un premier temps d'expliquer la manifestation de la vigueur pour un nombre réduit de locus pris individuellement et se décline sous deux principales formes. La première est l'hypothèse de la « **dominance ou complémentation** » et la seconde l'hypothèse de la « **sur-dominance** ». L'hypothèse de **dominance** suggère que les allèles récessifs délétères sont complétés chez les hybrides par des allèles améliorés du parent alternatif, générant une augmentation de la vigueur. Cela a pu être montré par exemple chez *Drosophila melanogaster* (Wu et al. 2016). Au contraire, l'hypothèse de **sur-dominance** attribue la vigueur hybride aux interactions synergiques des allèles à un ou plusieurs locus hétérozygotes (Birchler 2003; Baack & Rieseberg 2007; Birchler et al. 2006; Hochholdinger & Hoecker 2007). Les progrès plus récents dans le domaine des « Omiques » ont permis de préciser que d'importants changements au niveau de l'expression des gènes pouvaient être à l'origine d'une vigueur hybride chez la descendance. Ces changements transcriptomiques peuvent impliquer i) une sous expression de gènes, ii) une surexpression de gènes, voire même, iii) une expression allèle-spécifique (ou monoallélique) de gènes (Song et al. 2013; Guo et al. 2003), ou encore, iv) l'extinction de l'expression de certaines gènes. Les gènes sont classés en fonction de leur mode d'expression comparé à l'expression chez leurs parents. On trouve deux catégories de gènes

ayant un mode d'action « **additif** », ou « **non additif** ». Les gènes dits « **additifs** » ont un niveau d'expression égal à la moyenne des valeurs observées chez les parents, tandis que les gènes dits « **non additifs** » ont un niveau d'expression différent de la moyenne parentale. Selon l'expression de ces gènes « non additifs » chez les hybrides comparés aux parents on peut également les classer en plusieurs sous-catégories (Swanson-Wagner et al. 2006).

- Les gènes « **dominants** » ont un niveau d'expression située au-dessus ou en dessous de la valeur moyenne des deux parents.
- Les gènes « **sur-dominants** » ont un niveau d'expression supérieur au parent le plus fort
- Les gènes « **sous-dominants** » ont un niveau d'expression inférieur au parent le plus faible

Cependant ces modèles et modes d'action dans l'expression des gènes ne permettent pas d'expliquer à eux seuls la manifestation de la vigueur hybride pour un locus en particulier même si de très rares exemples attribuent la vigueur hybride à un seul locus (Hua et al. 2003). La manifestation de la vigueur hybride est causée par une multitude de mécanismes moléculaires, notamment des interactions synergiques entre allèles à différents locus (épistasie) et des changements dans le différentiel d'expression des gènes (Swanson-Wagner et al. 2006; Hua et al. 2003; Shapira et al. 2014). La vigueur hybride est donc un trait complexe dont les changements moléculaires se font à tous les niveaux : génétique, épigénétique, protéomique, et métabolomique (Shapira et al. 2014; Chen 2013). Le poids relatif de la génétique et de l'épigénétique est également peu connu mais des éléments ont été identifiés pour les deux mécanismes (Baranwal et al. 2012; Chen 2013).

Au niveau épigénétique (petits ARN, méthylation et modification d'histones), nous savons que ces modifications peuvent affecter la régulation de l'expression de nombreux gènes et donc la vigueur hybride (Chen 2013). Les avancements de la génomique ont permis de proposer un certain nombre d'hypothèses. Parmi celles-ci des arguments sont en faveur de l'idée que la vigueur hybride est générée par un effet cumulatif de la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans les voies métaboliques affectant le rendement ou l'efficacité globale de l'utilisation de l'énergie des individus hybride (Goff 2011; Baranwal et al. 2012). L'exploration des bases moléculaires de la vigueur hybride chez

d'autres organismes non modèles pourrait apporter une contribution importante dans la compréhension des processus sous-jacents.

d) Hybridation chez les parasites : des organismes négligés

Nous le disions précédemment, l'hybridation constitue une force évolutive majeure, et est reconnue comme un moteur de la diversification et de la radiation adaptative des espèces libres (Seehausen 2004; Barton 2001; Tsai et al. 1994; Mavárez et al. 2006; Mallet 2007). Les espèces en interaction durable, et notamment les parasites ont reçu très peu d'attention concernant le sujet (Detwiler & Criscione 2010). L'importance et la fréquence de l'hybridation ainsi que le rôle de l'introgession sont donc certainement sous-estimés (Arnold 2004; Machado & Ayala 2001; Detwiler & Criscione 2010). Le fait que les parasites sont par définition cachés au sein d'hôtes spécifiques et qu'ils ont parfois des caractéristiques morphologiques similaires entre espèces apparentées, peut expliquer l'écart entre le nombre d'hybrides détectés au sein des espèces d'animaux libres et des espèces parasites. De même le potentiel de rencontre entre espèces est certes contraint par l'exploitation d'hôtes différents et de la potentielle spécialisation de ces parasites dans des habitats intra-hôtes spécifiques (pour limiter la compétition pour l'habitat et les ressources nutritives), pourtant lorsqu'ils sont recherchés les hybrides au sein de parasites humains ne sont pas rares et ne dérogent donc pas à la règle. De nombreux parasites d'humain hybrides ont été identifiés chez les helminthes (13) et les protozoaires (4) mais restent peu caractérisés (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Recensement des cas d'hybridation au sein des parasites (King et al. 2015; Detwiler and Criscione 2010).

	Embranchement	Classe	Genre
Helminthes	Plathelminthes	Trématodes	<i>Schistosoma ; Fasciola ; Paragonimus ; Diplostomum</i>
		Cestodes	<i>Taenia ; Echinococcus</i>
		Monogènes	<i>Gyrodactylus</i>
	Nématodes	Secernentea	<i>Ascaris ; Contraecaecum ; Parascaris ; Pseudoterranova ; Trichinella ; Paramacrostrongylus</i>
Protozoaires	Apicomplexa	Aconoidasida	<i>Plasmodium</i>
		Conoidasida	<i>Toxoplasma</i>
	Euglenozoa	Kinetoplastea	<i>Leishmania ; Trypanosoma</i>

L'hybridation qu'elle soit ancienne ou récente joue donc potentiellement un rôle important dans l'évolution des parasites et des pathogènes. Les modifications phénotypiques potentielles apportées par l'hybridation via les processus d'introgession adaptative (comme nous avons pu le voir précédemment chez les espèces libres) constituent une réelle préoccupation en matière de génèse de nouveaux parasites hybrides en modifiant, i) les phénotypes originaux des espèces, ii) la transmission et l'épidémiologie des parasites, iii) l'évolution de la pathologie en affectant des facteurs clés dans la virulence, induisant par conséquent un risque pour la santé animale et humaine (Detwiler & Criscione 2010; Brasier et al. 1999; King et al. 2015; Arnold 2004).

En effet il a été démontré que les recombinaisons ou l'hybridation au sein de pathogènes humains augmente l'infectivité, la virulence, la transmission, ou la spécificité d'hôtes chez les champignons, les virus, les bactéries et les helminthes (Arnold 2004; Detwiler & Criscione 2010; King et al. 2015). Ces changements phénotypes importants, ont déjà été clairement montrés pour des croisements de laboratoire entre les espèces de schistosomes (Southgate et al. 1976; B. L. Webster & Southgate 2003; Webster 2003; Wright & Ross 1980). C'est sur ce modèle que se centre cette thèse où nous avons cherché à décrypter à plusieurs niveaux l'impact de l'hybridation sur les phénotypes « écologique » et « moléculaire » des schistosomes afin de comprendre comment la schistosomiase, une maladie habituellement cantonnée aux régions tropicales, a pu émerger et persister sous nos latitudes.

V) Hybridation au sein du genre *Schistosoma*: implication dans la valeur adaptative de la descendance

a) Le recensement des hybrides chez les parasites du genre *Schistosoma*

Le genre *Schistosoma* abrite une grande diversité d'espèces (**Figure 6**). Ces espèces ont été historiquement définies sur la base de leur morphologie (œufs et adultes), leur spécificité d'hôtes intermédiaires et définitifs, en fonction de leur tropisme dans l'hôte et sur des bases génétiques (Rollinson et al. 1997).

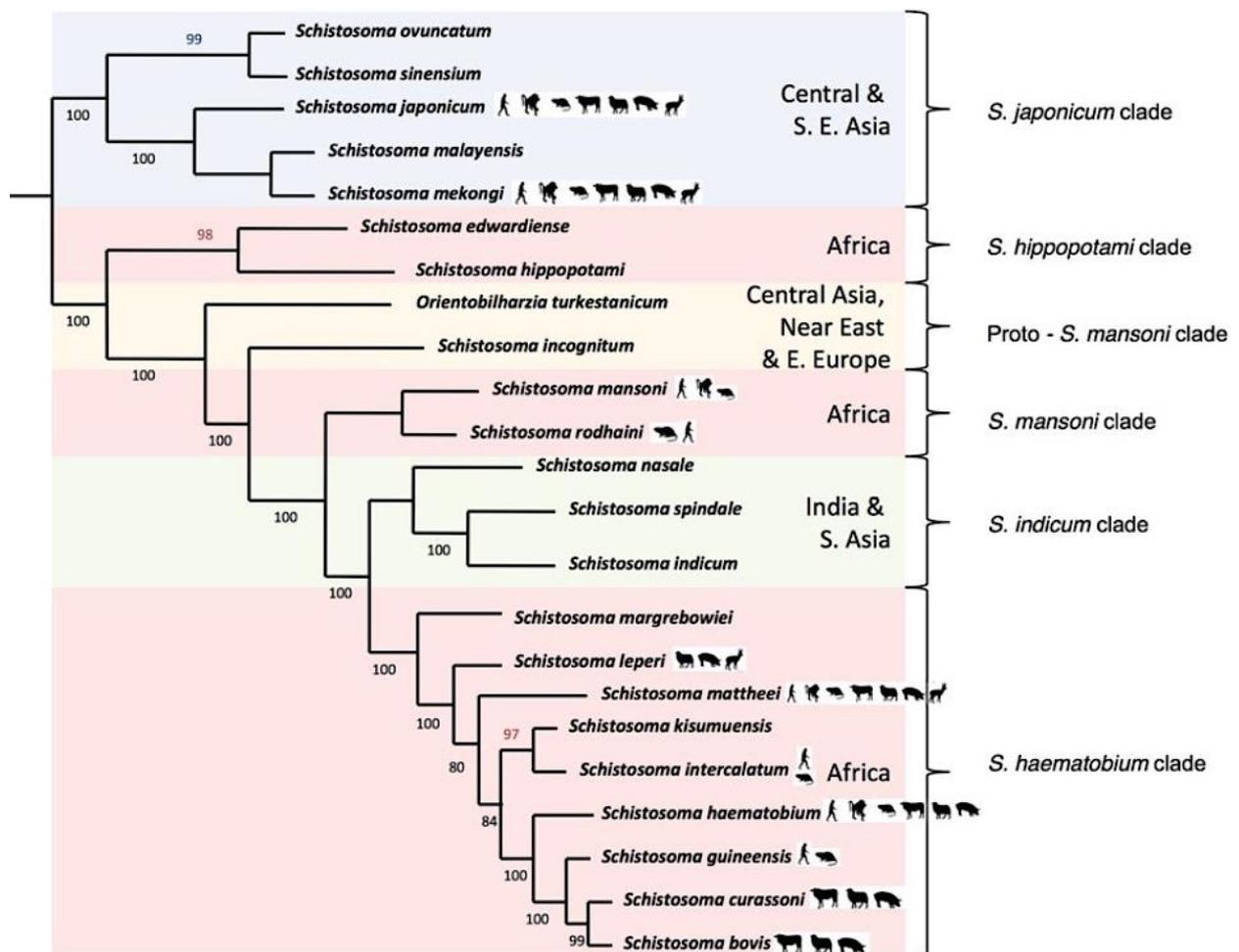


Figure 6 : Représentation schématisée des relations phylogénétiques entre les membres du genre *Schistosoma* et leurs principaux hôtes vertébrés (Seulement indiqués pour les principales espèces de schistosomes en matière de santé humaine et vétérinaire (adapté de Lawton et al. 2011 (Lawton et al. 2011) and Webster et al. 2006 (Webster et al. 2006)), (Leger & Webster 2016).

C'est le groupe *S. haematobium* (Lawton et al. 2011) qui est le plus diversifié, incluant 3 espèces infectant l'homme (*S. haematobium*, *S. intercalatum* et *S. guineensis*) et 6 espèces infectant les animaux (*S. bovis*, *S. curassoni*, *S. kisumuensis*, *S. leiperi*, *S. margrebowiei* et *S.*

matthei), principalement des ruminants et/ou des rongeurs. Les phénomènes d'hybridation sont relativement fréquents entre les espèces de schistosomes (voir (Léger & Webster 2016) pour synthèse) même si peu de données donnent un aperçu global de l'occurrence d'un tel phénomène sur le terrain. De nombreux hybrides naturels ont cependant été observés entre différentes espèces, et la fréquence de leur identification chez l'Homme ne fait qu'augmenter (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Hybrides naturels détectés au sein des schistosomes

Hybrides entre schistosomes d'humain			
<i>S. haematobium</i>	<i>S. intercalatum</i>	Cameroun, Gabon	Southgate 1976; Burchard and Kern 1985)
<i>S. haematobium</i>	<i>S. mansoni</i>	Sénégal, Cote d'Ivoire	T. Huyse et al. 2013; Le Govic Yohann et al. 2018, article en révision
<i>S. haematobium</i>	<i>S. guineensis</i>	Cameron and Bénin	B.L. Webster et al. 2005; Héléne Moné et al. 2012
Hybrides entre schistosomes d'animaux			
<i>S. bovis</i>	<i>S. curassoni</i>	Sénégal, Mali	Bonnie L. Webster et al. 2013; D. Rollinson et al. 1990
Hybrides entre schistosomes d'humain et d'animaux			
<i>S. mansoni</i>	<i>S. rodhaini</i>	Kenya, Tanzanie	Morgan et al. 2003; Steinauer et al. 2008
<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i>	Sénégal, Niger, Benin	Moné et al. 2015; Bonnie L. Webster et al. 2013; Tine Huyse et al. 2009 ; Brémond et al. 1993
<i>S. haematobium</i>	<i>S. matthei</i>	Afrique du Sud	Pitchford 1961
<i>S. haematobium</i>	<i>S. curassoni</i>	Sénégal	Bonnie L. Webster et al. 2013

Des hybrides ont été identifiés chez des schistosomes infectant l'homme (*S. haematobium* x *S. intercalatum* (Southgate et al. 1976; Burchard & Kern 1985), *S. haematobium* x *S. mansoni* (Huyse et al. 2013), *S. haematobium* x *S. guineensis* (Webster et al. 2005; Moné et al. 2012). D'autres hybrides ont été identifiés au sein d'espèces de schistosomes infectant les animaux *S. bovis* x *S. curassoni* (Webster et al. 2013; Rollinson et al. 1990). Puis, plus préoccupant en matière de transmission, des hybrides ont été identifiés entre des espèces de schistosomes infectant les humains et les animaux (*S. mansoni* x *S. rodhaini* (Morgan et al. 2003; Steinauer

et al. 2008), *S. haematobium* x *S. bovis* (Moné et al. 2015; Webster et al. 2013; Huyse et al. 2009; Bremond et al. 1993), *S. haematobium* x *S. mattheei* (Pitchford 1961), *S. haematobium* x *S. curassoni* (Webster et al. 2013). Nous présentons en **Encart 2** une étude préliminaire sur la possibilité d'hybridation entre *S. mansoni* et *S. bovis* deux espèces de schistosomes responsable de schistosomiase intestinale chez l'homme et les bovins, respectivement.

L'hybridation entre espèces de schistosomes d'animaux et d'humains, comme c'est le cas en Corse et au Sénégal, est particulièrement préoccupante car elle augmente potentiellement le risque d'hôtes réservoirs et de transmission zoonotique de la maladie. De façon intéressante, le groupe haematobium est fréquemment incriminé dans les phénomènes d'hybridation, en particulier l'espèce *S. haematobium* (voir (Leger & Webster 2016) pour synthèse). Les analyses moléculaires menées sur l'hybride identifié en Corse (Boissier et al. 2016), indique une origine Sénégalaise du parasite hybride (Nord Sénégal). Une précédente étude a montré que 88% des patients infectés (335 individus analysés dont 81% contaminés) contenaient des hybrides entre *S. haematobium* x *S. bovis*, démontrant que ces hybrides sont bien établis et largement distribués au Sénégal. Ils sont d'ailleurs probablement présents dans de nombreux autres pays africains notamment au Bénin, au Niger et au Mali (Webster et al. 2013; Huyse et al. 2009; Moné et al. 2015; Brémond et al. 1993). Des investigations supplémentaires récemment menées au laboratoire suggèrent que ces hybrides sont également présents dans d'autres pays africains et notamment en Côte d'Ivoire et au Cameroun.

Encart 2 : Hybridation et choix sexuels entre *S. mansoni* et *S. bovis*, deux espèces responsables de la schistosomiase intestinale chez l'Homme et les bovins, respectivement. Julien Kincaid-Smith, Damien Lassalle, Eve Toulza, Jérôme Boissier.

L'hybridation est un phénomène omniprésent au sein du genre *Schistosoma* et pourtant certains croisements semblent plus prévalents que d'autres sur le terrain. L'exemple classique vu au travers de cette thèse est le couple *S. haematobium* x *S. bovis*. Cependant des cas d'hybridation entre les deux espèces de schistosomes humains les plus prévalentes *S. haematobium* et *S. mansoni* ont également été rapportés. Cette dernière espèce, responsable de la schistosomiase intestinale chez l'homme est aussi souvent co-endémique avec l'agent principal de la schistosomiase intestinale chez le bétail (*S. bovis*). Néanmoins aucun cas d'hybridation entre ces deux dernières espèces n'a été reporté à notre connaissance ni sur le terrain ni expérimentalement, alors que ces deux espèces se retrouvent potentiellement fréquemment au sein des mêmes hôtes réservoirs (rongeurs) et partagent le même site de vie (Catalano et al. 2018). Des barrières pré- et/ou post-copulatoires pourraient être responsables de cette absence de flux génique entre ces espèces. Il est également possible que ces hybrides n'aient jamais été identifiés car on ne les a jamais recherchés spécifiquement. Pour avoir un premier aperçu de la possibilité d'occurrence du phénomène nous avons expérimentalement forcé l'appariement en effectuant des croisements réciproques entre ces espèces, et avons mené des expériences de choix sexuels pour déterminer l'existence de barrières à la reproduction. Nous avons identifié à la fois des couples homosécifiques mais aussi hétérosécifiques, ce qui suggère que l'hybridation entre ces espèces est possible *in natura*. Cependant les expériences de choix sexuels sont à refaire à cause de la faible infectivité de la souche de *S. bovis* pendant l'expérience ne nous permettant pas de conclure quant à la significativité des choix. Quoiqu'il en soit les femelles étaient matures sexuellement ce qui suggère que les mâles des espèces respectives ont la capacité d'induire ce processus de maturation malgré la distance phylogénétique entre ces espèces. Tandis que les œufs produits par le croisement entre un mâle *S. mansoni* et une femelle *S. bovis* n'étaient pas capable de produire une larve infectante pour les hôtes respectifs des espèces parentales (*Biomphalaria glabrata* pour *S. mansoni* et *Bulinus truncatus* pour *S. bovis*), les *miracidia* étaient mobiles mais faiblement vigoureux, potentiellement issus de parthénogenèse comme cela a déjà été mis en évidence au sein d'autres croisements (Tchuem Tchuente et al. 1994; Jourdan et al. 1995). Les expérimentations sont à reconduire selon moi en prenant en compte le différentiel de temps de développement entre les espèces parentales, et en améliorant le protocole expérimental. Concernant le croisement réciproque entre mâle *S. bovis* x femelle *S. mansoni* les *miracidia* étaient capables d'infecter 81% des mollusques (21/26) du genre *Biomphalaria* sp. en utilisant 1 *miracidium* et 100% des mollusques (31/31) en utilisant 5 *miracidia*. Ces résultats suggèrent de la vigueur hybride pour ce croisement car les niveaux de prévalence de l'espèce parentale qui infecte habituellement *Biomphalaria* sont de 50% avec 1 *miracidium* et de 80% avec 5 *miracidia*. En revanche aucun mollusque hôte de la lignée paternelle (*Bulinus truncatus*) n'était infecté (0/33 et 0/28). Malgré le fait que ce travail nécessite d'être repris avec plus de précaution afin d'éclaircir le potentiel d'hybridation entre ces deux espèces ceci semble montrer une fois de plus que les barrières à la reproduction au sein des schistosomes sont perméables. Les cas d'hybridation entre *S. mansoni* et *S. bovis* sont donc envisageables sur le terrain.

b) Conséquences de l'hybridation sur les traits écologiques des schistosomes

Les schistosomes sont des organismes avec un cycle de vie complexe. Ainsi, l'hybridation peut affecter les traits de vie du parasite au niveau de son interaction avec l'hôte intermédiaire mais aussi en rapport avec l'hôte définitif.

- **Conséquences de l'hybridation sur l'interaction mollusque/parasite**

Au niveau des hôtes intermédiaires, les parasites purs sont en général capables d'infecter seulement un nombre restreint de mollusques. L'hybridation permet de rompre cette spécificité d'hôte. Le parasite devient alors capable d'infecter les hôtes naturels des deux parents (B. L. Webster & Southgate 2003; Huyse et al. 2009; D. Rollinson et al. 1997). Par exemple il a été montré expérimentalement que tandis que *S. haematobium* infecte seulement *Bulinus truncatus* et *S. intercalatum* infecte uniquement *Bulinus forskalii*, leurs descendants hybrides ont la capacité d'infecter les deux espèces de mollusque (B L Webster & Southgate 2003). Cette augmentation du spectre d'hôtes a également été mise en évidence sur le terrain pour des hybrides entre *S. haematobium* et *S. bovis* (Huyse et al. 2009). Dans cette étude les auteurs montrent que *S. haematobium* n'est normalement pas compatible avec la souche sympatrique de *B. truncatus* présente dans cette région du Sénégal. En revanche il utilise *B. globosus* pour sa transmission dans cette région du Sénégal (D. Rollinson et al. 1997). L'hybride entre *S. haematobium* et *S. bovis* quant à lui est capable d'infecter à la fois *B. globosus* et *B. truncatus* (Huyse et al. 2009). En plus de cet élargissement du spectre d'hôte intermédiaire, l'hybridation peut conférer une meilleure infectivité au parasite. Ceci a été également montré expérimentalement pour des hybrides entre *S. haematobium* x *S. guineensis* (B. L. Webster & Southgate 2003) et pour *S. haematobium* x *S. mattheei* (Wright & Ross 1980; Taylor 1970). Dans le cas des *S. haematobium* x *S. guineensis*, les *miracidia* hybrides étaient capables d'infecter 77% de *B. truncatus* contre 32% pour le parasite pur *S. haematobium*. De plus le temps de développement des larves au sein du mollusque (phase prépatente) était plus court (25 jours) par rapport aux parents purs (35 ou 50 jours pour *S. intercalatum* ou *S. haematobium*, respectivement) (B. L. Webster & Southgate 2003).

- **Conséquences de l'hybridation sur l'interaction vertébré-parasite**

Les traits d'histoire de vie des schistosomes hybrides sont aussi modifiés en ce qui concerne l'interaction du parasite avec l'hôte vertébré. Les hybrides présentent en général une infectivité plus grande, et un potentiel reproductif plus élevé au sein de l'hôte. Ce gain dans la transmission du parasite a été mis en évidence pour des hybrides F1 issus du croisement entre *S. haematobium* et *S. mattheei*, mais aussi pour des hybrides entre *S. haematobium* et *S. intercalatum* (Li et al. 1996; Webster et al. 2013; Southgate et al. 1976; Wright et al. 2012; B. L. Webster & Southgate 2003). Dans certains cas des parasites normalement inféodés à l'homme comme *S. haematobium* deviennent capable d'infecter des animaux. Par exemple les hybrides *S. haematobium* x *S. mattheei* sont capables d'infecter expérimentalement des moutons (Tchuem Tchuente, Southgate, Jourdane, et al. 1997) et ont potentiellement été retrouvés sur le terrain chez des bovins (De Bont et al. 1994). À l'inverse des schistosomes normalement inféodés aux animaux (*S. curassoni* x *S. bovis*) sont capables d'infecter naturellement les humains (Léger et al. 2016). Ceci met en évidence le potentiel zoonotique et le risque d'animaux réservoirs pour de tels hybrides.

- **Conséquences de l'hybridation sur la transmission et le contrôle de la maladie**

L'ensemble des modifications phénotypiques induites par l'hybridation peuvent avoir des implications sérieuses en termes de santé humaine et de contrôle de la maladie. Elles peuvent altérer aussi bien le diagnostic parasitologique que le traitement des populations. L'hybridation peut modifier la morphologie des œufs produits par les parasites mais aussi leur lieu d'excrétion menant à une discordance entre la symptomatologie et le diagnostic parasitologique. En effet dans le cas de l'hybride entre *S. haematobium* et *S. bovis* des œufs ont été identifiés à la fois dans les fèces et l'urine des patients (Huyse et al. 2009). Quoiqu'il en soit l'excrétion spécifique ou combinée des œufs de parasites hybrides au niveau des fèces et/ou de l'urine doit être prise en compte dans les pays endémiques afin d'améliorer le diagnostic qui se focalise habituellement uniquement sur une des formes de la maladie.

Concernant le traitement de la maladie, rien n'a à ce jour été étudié concernant l'utilisation du Praziquantel sur les parasites hybrides. En revanche, une précédente étude a suggéré que la faible efficacité du traitement à l'oxamniquine contre *S. mattheei* chez le bétail était potentiellement due à l'hybridation entre *S. mattheei* et *S. haematobium* (Pitchford & Lewis

1978). Certains auteurs suggèrent même que l'expansion des hybrides en Afrique soit due à une partielle baisse de la sensibilité au Praziquantel, seul traitement utilisé en chimiothérapie de masse (Huyse et al. 2009; Webster et al. 2013). Des tests futurs se focalisant sur la réponse des hybrides au traitement sont donc nécessaires.

D'un point de vue épidémiologique, les hybrides pourraient aussi avoir la capacité de s'emparer de l'aire de distribution géographique des espèces pures par extinction génétique comme cela a déjà été observé. À Loum (Cameroun), *S. haematobium* et les hybrides entre *S. haematobium* x *S. intercalatum* ont complètement remplacé l'espèce initialement présente (*S. intercalatum*) en moins de 30 ans (Tchuem Tchuente et al. 1997).

- ***S. bovis* et *S. haematobium*, des parasites aux traits d'histoire de vie contrastés**

Dans le cas de *S. haematobium* et *S. bovis*, les traits d'histoire de vie des deux espèces sont fortement contrastés (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Comparaison des phénotypes entre *S. bovis* et *S. haematobium*

Compartiment	Traits d'histoire de vie	<i>S. bovis</i>	<i>S. haematobium</i>
Vertébré	Hôte principal	Ruminants	Hommes
	Lieux de vie	Veines mésentériques	Veines du plexus péri-vésical
	Temps de développement	90 jours	120 jours
	Site d'excrétion des œufs	Fèces	Urine
	Morphologie des œufs	Allongé (en fuseau) 200 x 65 µm	Rond à ovale 150 x 50 µm
Mollusque	Hôte spécifique	<i>Bulinus sp.</i> <i>Planorbarius</i>	<i>Bulinus sp.</i>
	Temps de développement	30 jours	42 jours
	Emission cercarienne	Le matin (8-9 h)	L'après-midi (12-15 h)

Concernant l'hôte définitif vertébré, *S. bovis* vit dans les veines mésentériques de ses hôtes définitifs et est responsable de la schistosomiase intestinale principalement chez les bovins,

les ovins et les caprins. *S. haematobium* est quant à elle la seule espèce de schistosome vivant dans les vaisseaux entourant la vessie des humains infectés et est responsable de la schistosomiase urogénitale. Chez l'hôte vertébré, *S. bovis* a un temps de développement plus précoce (90 jours) comparé à *S. haematobium* (120 jours). Les œufs de *S. bovis* sont émis via les fèces des animaux à l'inverse de la bilharziose urogénitale (*S. haematobium*) où les œufs sont émis via l'urine. La morphologie des œufs est également différente entre ces espèces. Les œufs de *S. bovis* ont une forme allongée (en fuseau). Ils sont généralement plus grands que les œufs de *S. haematobium* et mesurent entre 170-200 µm de long et 55-65 µm de large (Pitchford 1965; Alves 1948; Rollinson et al. 1990). Les œufs de *S. haematobium* ont une forme ronde à ovale (elliptique ou allongée) avec éperon en position terminale. Ils mesurent en moyenne entre 100-150 µm de long et 40-50 µm de large (Capron et al. 1965; Pitchford 1965; Moné et al. 2012; Loker 1983; Richard-Lenoble et al. 1993; Alves 1948).

Concernant l'hôte intermédiaire *S. bovis* a une gamme d'hôtes intermédiaires plus large avec la capacité d'exploiter à la fois *Bulinus sp.* et *Planorbarius*, alors que *S. haematobium* est spécifique à *Bulinus*. Le temps de développement de *S. bovis* est de 30 jours chez le mollusque comparé à 42 jours pour *S. haematobium*. De plus, *S. bovis* a co-évolué avec les activités aquatiques de son hôte définitif et les cercaires sont émises à des heures matinales lorsque les animaux vont boire (pic d'émission maximum autour de 8-9h) (Théron 2015; Pages & Théron 1990). En revanche l'émission cercarienne de *S. haematobium* est adaptée aux activités aquatiques de l'homme qui se situe en général dans l'après-midi (pic d'émission maximum autour de 12-15h) (Théron 2015; Pages & Théron 1990).

Certains auteurs ont mis en évidence expérimentalement que, i) des couples hétérospécifiques se forment chez les hamsters et produisent une descendance de première génération viable (Webster et al. 2013), mais aussi que, ii) la progéniture issue du croisement entre *S. haematobium* et *S. bovis* a un patron d'émission cercarienne similaire à son parent *S. bovis* (Pages & Théron 1990; Théron 2015). Nous connaissons donc très peu l'impact de l'hybridation sur le phénotype de ces deux espèces et tout reste à faire.

c) De l'écologie à la molécule : quelle base à la vigueur hybride chez *Schistosoma* ?

La caractérisation de la vigueur hybride chez les schistosomes a été effectuée pour un certain nombre de croisements et traits d'histoire de vie des parasites comme nous l'avons

vu dans la partie précédente. Certaines études menées au niveau moléculaire ont permis de démontrer que suivant les espèces et les croisements, l'introgression génomique était soit unidirectionnelle (Steinauer et al. 2008) ou bidirectionnelle (Webster et al. 2013; Huyse et al. 2009). Seuls des marqueurs neutres ont jusqu'alors été utilisés dans ce contexte d'introgression chez les schistosomes. Aucune étude sur des gènes fonctionnels faisant la relation avec les modifications de traits d'histoire de vie apportées par l'hybridation chez ces parasites n'a été menée. Comme cela a pu être suggéré dans le passé (Steinauer et al. 2010), de telles études pour mieux appréhender la biologie des schistosomes seraient d'un intérêt certain mais là encore tout reste à faire.

VI) Mise en contexte, objectifs et problématiques de la thèse

Les récents épisodes inattendus d'émergence de schistosomiase aux portes de l'Europe continentale, en Corse ont soulevé de nombreuses questions tant sur le plan scientifique que médical. Une approche intégrative a été menée dans ce travail de thèse afin d'étoffer nos connaissances sur les conséquences de l'hybridation entre deux espèces majeures de schistosomes, *S. haematobium* et *S. bovis*. Ce travail combine à la fois des approches de laboratoire et de terrain avec une réflexion générale de ce que nous savons de la transmission des schistosomes en zone endémique.

Le premier objectif de cette thèse a été la caractérisation du parasite qui a émergé en Corse. Dans un premier temps nous avons retracé son origine et analysé sa transmission sur des échantillons de terrain (**Chapitre 1.1**). Dans un second temps nous avons déterminé sa composition génomique (niveau d'introgression) et la perméabilité des deux espèces aux allèles de l'autre au niveau du génome complet après séquençage massif (**Chapitre 1.2**).

Le second objectif était de recréer le processus d'hybridation au laboratoire et de comparer ces hybrides expérimentaux avec les espèces parentales sur le plan phénotypique et moléculaire. Pour cela nous avons mis en place les outils nécessaires afin d'élaborer un protocole d'évolution expérimentale permettant de contrôler les niveaux d'introgression et la composition génomique de chaque lignée. Pour effectuer les croisements nous avons mis au point des marqueurs moléculaires permettant de déterminer le sexe des larves infectantes (cercaires) (**Chapitre 2.1**). Une fois ces outils disponibles nous avons cherché à déterminer les potentielles barrières pré-zygotiques à travers l'analyse des choix sexuels des deux espèces (**Chapitre 2.2**). Dans cette étude nous avons également étudié les effets pré-

zygotiques par une approche de transcriptomique comparative. En effet, nous avons analysé les transcriptomes des mâles et des femelles lorsqu'ils sont accouplés avec des partenaires de la même espèce ou d'une espèce différente.

Le troisième objectif a été de caractériser les capacités invasives de douze lignées de parasites générées à la suite du protocole d'hybridation expérimentale et de les comparer à leurs parents mais également à l'hybride naturel ayant émergé en Corse (**Chapitre 3.1 et 3.2**). Il s'agissait d'évaluer les conséquences de l'hybridation entre *S. haematobium* et *S. bovis* sur la valeur adaptative des différents hybrides. Les analyses se sont focalisées sur les modifications de traits d'histoire de vie (virulence, infectivité, spectre d'hôtes) mais également sur les modifications transcriptomiques sous-jacentes aux phénotypes observées. Les analyses des traits d'histoire de vie des parasites ne sont pas exhaustives mais permettent d'avoir une vision d'ensemble du cycle de vie des schistosomes en se focalisant particulièrement sur les traits impliqués dans la transmission du parasite à la fois au niveau de son interaction avec l'hôte définitif (expérimental) et les hôtes intermédiaires représentatifs des deux espèces parentales de parasites. (i) concernant l'hôte définitif nous voulions évaluer si l'hybride était plus virulent, se développait plus facilement, et provoquait une pathologie accrue comparée aux espèces parentales. (ii) concernant les mollusques vecteurs nous avons évalué si les hybrides étaient capables d'exploiter les hôtes des deux parents (*Bulinus* et *Planorbarius*) provenant de différentes localités (Corse, Espagne, Cameroun) afin d'évaluer les risques d'émergence en Europe et les capacités d'expansion du parasite vers les latitudes Nord.

Objectifs :

- a) Comprendre quel est le **potentiel adaptatif** et la **virulence** des schistosomes hybrides entre *S. haematobium* et *S. bovis* qui ont émergé en Corse.
- b) Déterminer le **rôle de l'hybridation** dans cette émergence et préciser au niveau **écologique** par l'analyse des **traits d'histoire de vie** et de leurs **bases moléculaires** les **capacités invasives** des formes hybrides comparées aux parents.

Cette thèse se base sur la mise en place d'un protocole d'**évolution expérimentale** visant à recréer en laboratoire le processus d'hybridation entre ces espèces en allant de la **rencontre** aux **choix sexuels** des parasites au sein d'un même hôte, jusqu'aux **phénotypes** de descendants hybrides issus de croisements et rétrocroisements entre et avec les espèces parentales. Nous tentons ensuite d'interpréter ces résultats à la lumière de la dynamique de transmission de la schistosomiase sur le **terrain**.

Chapitre 1: Caractérisation du schistosome qui a émergé en Corse

1) Enquête épidémiologique et caractérisation moléculaire du parasite sur deux marqueurs (COI et ITS)

- **Publication** : Boissier, J. Grech-Angelini, S. Webster, B.L. Allienne, J.F. Huyse, T. Mas-Coma S., Toulza E., Barre-Cardi H., Rollinson D., **Kincaid-Smith J.**, Oleaga A., Galinier R., Foata J., Rognon A., Berry A., Mouahid G., Henneron R., Mone H., Noel H., Mitta G. (2016). Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, online: 2016 May 16. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00175-4

Ce travail décrit l'enquête épidémiologique menée en Corse après l'identification du foyer de schistosomiase. Dans un premier temps nous avons identifié les sites de transmission du parasite le long de la rivière du Cavu en Corse et confirmé grâce à des infestations expérimentales que l'espèce *Bulinus truncatus* présente sur le site est bien le vecteur responsable de la maladie. Dans un second temps, ce travail a permis d'identifier/confirmer l'espèce de parasite responsable du foyer de transmission. Nous avons caractérisé le parasite au niveau moléculaire à partir de l'ADN d'œufs récupérés à partir de 12 patients. Pour cela nous avons utilisé une approche de génétique basée sur deux marqueurs, un gène nucléaire (ITS2) et un gène mitochondrial (COI). Les résultats ont révélé une situation épidémiologique complexe et inattendue. En effet, tandis que la majorité des séquences ITS étaient caractéristiques de l'agent typique de la schistosomiase urogénitale (*S. haematobium*), une séquence était caractéristique d'un schistosome du bétail (*S. bovis*), et alors que certaines séquences COI étaient caractéristiques de *S. haematobium*, d'autres étaient caractéristiques de *S. bovis*. À l'échelle des œufs 41% des œufs étaient hybrides (incohérence entre les deux marqueurs), 58% correspondaient à *S. haematobium* et 1% à *S. bovis* sur les deux marqueurs. Le parasite incriminé n'était donc pas un parasite pur apparentant à l'espèce *S. haematobium* mais un hybride entre *S. haematobium* et *S. bovis* agent de la schistosomiase intestinale chez les ruminants (Boissier et al., 2016; Moné et al., 2015). De plus grâce à ces marqueurs moléculaires nous montrons que ces hybrides ont une origine Sénégalaise, où ils ont d'ailleurs été identifiés pour la première fois (Huyse et al. 2009). Dans ce travail j'ai particulièrement participé aux études menées sur le terrain.



Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study

Jérôme Boissier, Sébastien Grech-Angelini, Bonnie L Webster, Jean-François Allienne, Tine Huyse, Santiago Mas-Coma, Eve Toulza, Hélène Barré-Cardi, David Rollinson, Julien Kincaid-Smith, Ana Oleaga, Richard Galinier, Joséphine Foata, Anne Rognon, Antoine Berry, Gabriel Mouahid, Rémy Henneron, Hélène Moné, Harold Noel, Guillaume Mitta

Summary

Background Schistosomiasis is a snail-borne parasitic disease endemic in several tropical and subtropical countries. However, in the summer of 2013, an unexpected outbreak of urogenital schistosomiasis occurred in Corsica, with more than 120 local people or tourists infected. We used a multidisciplinary approach to investigate the epidemiology of urogenital schistosomiasis in Corsica, aiming to elucidate the origin of the outbreak.

Methods We did parasitological and malacological surveys at nine potential sites of infection. With the snails found, we carried out snail–parasite compatibility experiments by exposing snails to schistosome larvae recovered from the urine of a locally infected Corsican patient. Genetic analysis of both mitochondrial (*cox1*) and nuclear (internal transcribed spacer) DNA data from the *Schistosoma* eggs or miracidia recovered from the infected patients was conducted to elucidate the epidemiology of this outbreak.

Findings We identified two main infection foci along the Cavu River, with many *Bulinus truncatus* snails found in both locations. Of the 3544 snails recovered across all sites, none were naturally infected, but laboratory-based experimental infections confirmed their compatibility with the schistosomes isolated from patients. Molecular characterisation of 73 eggs or miracidia isolated from 12 patients showed infection with *Schistosoma haematobium*, *S haematobium*–*Schistosoma bovis* hybrids, and *S bovis*. Further sequence data analysis also showed that the Corsican schistosomes were closely related to those from Senegal in west Africa.

Interpretation The freshwater swimming pools of the Cavu River harbour many *B truncatus* snails, which are capable of transmitting *S haematobium*-group schistosomes. Our molecular data suggest that the parasites were imported into Corsica by individuals infected in west Africa, specifically Senegal. Hybridisation between *S haematobium* and the cattle schistosome *S bovis* had a putative role in this outbreak, showing how easily and rapidly urogenital schistosomiasis can be introduced and spread into novel areas where *Bulinus* snails are endemic, and how hybridisation could increase the colonisation potential of schistosomes. Furthermore our results show the potential risk of schistosomiasis outbreaks in other European areas, warranting close monitoring and surveillance of all potential transmission foci.

Funding WHO, ANSES, RICET, and the Ministry of Health and Consumption.

Introduction

Increases in human travel, animal migration, and environmental changes are expected to promote the emergence of tropical infectious diseases in higher latitude environments.¹ However, examples of the emergence of tropical infectious diseases in temperate areas remain scarce, with most reports being about diseases transmitted by arthropod vectors, including dengue, malaria, and chikungunya, which have been reported in southern parts of Europe including Italy and France.^{2–4}

Aquatic freshwater snails are intermediate hosts (referred to as vectors in the case of vector-borne diseases) for several diseases caused by helminths, including the highly prevalent and debilitating neglected tropical disease schistosomiasis. This disease results from infection with parasitic worms of the *Schistosoma* genus and remains one of the world's most important neglected tropical diseases. Infection results from contact with fresh water that is contaminated with the free-swimming schistosome cercariae that are shed from infected snails.

Schistosoma haematobium causes human urogenital schistosomiasis and is transmitted by snails of the genus *Bulinus*.⁵ The geographical range of *S haematobium* covers Africa, parts of the Middle East, Madagascar, and the Indian Ocean islands. More people are infected with *S haematobium* than with all the other schistosome species combined.⁶ Of the more than 110 million cases of schistosomiasis in sub-Saharan Africa, 70 million are associated with haematuria, 18 million with bladder wall pathology, and 10 million with hydronephrosis leading to severe kidney disease^{7,8} and even bladder cancer.⁹ An estimated 16 million women have female genital schistosomiasis, which causes complications related to fertility and transmission of HIV or other sexually transmitted infections.¹⁰ *S haematobium* eggs are voided in the urine of infected individuals and these eggs hatch when in contact with fresh water, releasing free-swimming miracidia that infect, develop, and replicate within suitable *Bulinus* snail hosts.¹¹ *Schistosoma bovis* is a closely related sister species to *S haematobium* that causes intestinal

Lancet Infect Dis 2016

Published Online

May 16, 2016

[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00175-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00175-4)

See Online/Comment

[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30061-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30061-5)

Université de Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Université de Montpellier, Perpignan, France (J Boissier PhD, J-F Allienne BSc, E Toulza PhD, J Kincaid-Smith MSc, R Galinier PhD, A Rognon MSc, G Mouahid PhD, H Moné PhD, G Mitta PhD); INRA, Laboratoire de recherches sur le développement de l'élevage, Corte, France

(S Grech-Angelini MD); Department of Life Sciences, Parasites and Vectors Division, Natural History Museum, London, UK (B L Webster PhD, D Rollinson PhD); London Centre for Neglected Tropical Disease Research, London, UK (D Rollinson, B L Webster); Department of Biology, Royal Museum for Central Africa, Tervuren, Belgium and Laboratory of Biodiversity and Evolutionary Genomics, Biology, University of Leuven, Leuven, Belgium (T Huyse PhD); Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia, Spain (S Mas-Coma PhD); OCIC, ECOTER, Office de l'Environnement de la Corse, Corte, France (H Barré-Cardi PhD); Unité de suivi entomologique et de politique de lutte anti vectorielle, Agence régionale de santé de Corse, Ajaccio, France (H Barré-Cardi); Parasitology Laboratory, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Salamanca, Spain (A Oleaga PhD); Equipe parasites et écosystèmes méditerranéens, UMR 6134 CNRS SPE Science pour

l'environnement, Université de Corse Pascal Paoli, Corte, France (J Foata PhD); Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Toulouse and Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université de Toulouse, Toulouse, France (A Berry MD); Hôpital Sainte Marguerite, Hôpital Sud de Marseille, Marseille, France (R Henneron MD); and French Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire, InVS), Saint-Maurice, France (H Noel MD)

Correspondance to: Dr Jérôme Boissier, Université de Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Université de Montpellier, Perpignan F-66860, France boissier@univ-perp.fr

Research in context

Evidence before this study

Reports of the emergence of vector-borne tropical diseases in European countries are scarce and mainly related to arthropod-borne diseases (eg, dengue and chikungunya). Human schistosomiasis, which is transmitted by freshwater snails, is regarded as a tropical disease found in developing countries, so the outbreak in southern Europe in 2013 was unexpected. We searched PubMed, Science Direct, and the WHO bibliographic databases for reports of human schistosomiasis in Europe, with no restrictions on date or language, using the terms “*Schistosoma*” and “Europe”. Ten reports in English and Portuguese described a unique human outbreak of urogenital schistosomiasis in Portugal from 1920 to 1967. Morphological evidence suggested that the outbreak was due to infection with *Schistosoma haematobium* and experimental studies showed compatibility between the local strain of freshwater snail and several African strains of *S haematobium*. It was concluded that this outbreak was probably a result of the introduction of the parasite by people travelling between Angola, where schistosomiasis is endemic, and Portugal. However, at that time, no molecular tools were available to characterise the parasite or establish its origin. Subsequently, urogenital schistosomiasis was eliminated from Portugal in the early 1970s and has not been detected in Europe since. Since 2013, six reports have described an outbreak of urogenital schistosomiasis on the Mediterranean Island of Corsica, which has alerted the scientific community to the risk of urogenital schistosomiasis transmission in southern Europe. Additionally, we reported the first molecular description of the parasites from this outbreak, which we obtained from a single German

patient. We showed that the patient was infected with not only *S haematobium*, but also with *S haematobium*–*Schistosoma bovis* hybrids.

Added value of this study

Our results can be used to create a map of transmission risk that could describe the location and abundance of compatible snail vectors, pinpoint the sources of infection, and aid future transmission monitoring and surveillance. Additional molecular data from parasites isolated from several infected tourists and Corsican locals, combined with existing data, suggests that the Corsican outbreak was the result of importation of the parasite from west Africa.

Implications of all the available evidence

Global changes, especially increases in mean temperatures and human movement, are expected to promote the emergence of tropical infectious diseases in higher latitudes than they are currently endemic in. Mosquito-borne diseases such as dengue, malaria, chikungunya, or Zika virus have captured the attention of the scientific community, but the risk of the emergence of schistosomiasis, a tropical snail-borne disease, has not been considered an imminent threat. Evidence shows that compatible snail vectors are endemic in several European countries, which raises the possibility of a new public health threat in Europe through the importation of schistosomes. Genetic data have proved fundamental to establish the origin of the Corsican outbreak and will be crucial for future epidemiological studies on schistosomiasis.

schistosomiasis in ruminants and is a major veterinary problem across Africa, but can also be found in European Mediterranean countries.^{12–14} Similar to *S haematobium*, *S bovis* is also transmitted by *Bulinus* snail species and both schistosome species inhabit sympatric geographical areas. This close phylogenetic association, combined with overlapping geographical distributions, enables hybridisation between *S haematobium* and *S bovis*, as has been reported in west African countries, namely Senegal.^{15,16} Hybridisation can alter disease epidemiology and enhance phenotypic characteristics that affect transmission and host compatibility.¹⁷ This hybridisation is especially important in relation to snail–parasite compatibility, whereby hybridisation can enable the use of a wider range of snail species and hosts¹⁶ and enhance the expansion potential of the disease.

At the beginning of 2014 a cluster of urogenital schistosomiasis cases were diagnosed in patients in France (March, 2014) and Germany (January, 2014).^{18–20} The patients had never visited a schistosomiasis-endemic country, but all had spent their holidays in southern Corsica in August, 2013. Corsica, a French Mediterranean island, is very popular with tourists because of its natural

beauty and Mediterranean climate. The freshwater intermediate host for schistosomes, *Bulinus truncatus*, is endemic in Corsica,¹³ widely distributed throughout the perimeter of the island.²¹ The infected individuals had all been swimming in the Cavu River in the north of Porto Vecchio. After these first cases were reported, the French Institute for Public Health Surveillance (Institut National de Veille Sanitaire [InVS]) and the European Centre for Disease Prevention and Control published a rapid risk assessment, which was followed by a large campaign between April, 2014, and April, 2015, to increase awareness of the risk of urogenital schistosomiasis infection in Corsica and the possible misdiagnosis of haematuria by European health practitioners. Subsequently, 124 more cases were reported in French nationals who visited Corsica and swam in the Cavu River in 2013. A case of acute schistosomiasis acquired in Corsica during the summer of 2015 has also been reported, suggesting that transmission is still persisting²² and poses a risk for further infections. Preliminary molecular analysis of schistosome eggs obtained from a German national who had the first reported case of urogenital schistosomiasis acquired in Corsica

showed the involvement of *S haematobium* and *S bovis*–*S haematobium* hybrids²³ in the infection. In this study we used a multidisciplinary approach to investigate the epidemiology of urogenital schistosomiasis in Corsica, aiming to elucidate the origin of the outbreak.

Methods

Water contact site, livestock, and malacological surveys

Nine potential sources of infection (water contact sites) were identified from family holiday photographs and testimonials from local Corsican patients (figure 1). Cows and goats local to the Cavu River were tested by ELISA for schistosome infections, using methods described previously.²⁴ After the first cases of urogenital schistosomiasis acquired in Corsica were identified, snail surveys were done along the Cavu River, from May to September, 2014, aiming to find the sites of transmission. Surveys were done in a consistent manner at nine bathing sites that had been visited by at least one patient. Snails were collected with a sieve from all areas of the freshwater pools and aquatic plants at each site until no more could be readily found. The same approach was used at each site, and we compared random snail repartition between the different sites with the χ^2 test. All morphologically identified *Bulinus truncatus* snails were tested for schistosome patent infection by cercarial shedding immediately and for several weeks after collection.

Larval schistosome sampling

After the publication of the rapid risk assessment and the campaign to increase awareness of the risk of urogenital schistosomiasis infection in Corsica,

patients who were serologically diagnosed with urogenital schistosomiasis by physicians in Corsica and on the European continent were asked to provide urine samples to confirm diagnosis by parasitological analyses. The samples were examined microscopically for the presence of characteristic terminal spined schistosome eggs, and positive samples were stored at 4°C or in ethanol, then sent to the UMR5244 laboratory in Perpignan (France) for parasitological sampling. The samples were recorded as having come from either infected Corsican locals or tourists, but patients' details remained anonymous. No patients had ever been to a schistosomiasis-endemic area and all had been swimming in the Cavu River in the summer of 2013. This study was approved by the French Commission for Data Protection (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) as part of the public health response. Data were processed anonymously and all schistosomiasis-positive patients were treated with praziquantel.

Eggs were microscopically removed individually with an elongated Pasteur pipette from each urine sample, and when viable (ie, for eggs not stored in ethanol), attempts were made to hatch the eggs by placing them in fresh water. Any non-hatched eggs or free-swimming miracidia were individually captured using a pipette and prepared for DNA extraction.

Molecular characterisation of schistosome miracidia or eggs

DNA was extracted from individual miracidia or eggs²⁵ and the complete nuclear ribosomal DNA (rDNA)

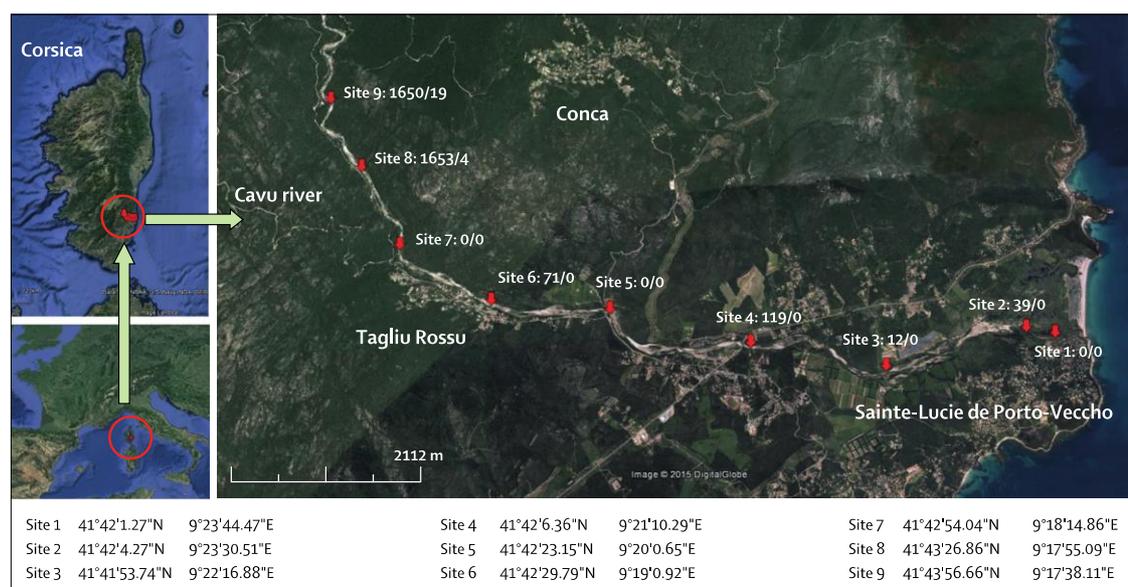


Figure 1: Map of the Cavu River in the south of Corsica

Malacological sampling was done at sites 1–9 along the Cavu River. n/n=number of *Bulinus truncatus* snails collected at the site/number of infected patients that had unique water contact at the site

See Online for appendix

internal transcribed spacer (ITS) region and a partial fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*cox1*) gene were amplified by PCR and sequenced by a subcontractor (Genoscreen, Lille, France)

for species characterisation (appendix p 1). The sequences were assembled and manually edited with Sequencher software version 4.5. Sequence polymorphisms were checked and confirmed by visualisation of the raw sequence chromatograms. Nuclear and mitochondrial profiles were assigned to each individual egg or miracidium analysed, as described previously^{15,16} (appendix p 1).

The *S bovis* or *S haematobium cox1* sequences obtained from the eggs or miracidia were grouped separately and then collapsed to group identical sequences of each species, creating unique haplotypes (appendix p 2). The type of haplotype polymorphism and the numbers of individual samples representing each haplotype were recorded (tables 1–3). In our phylogenetic analysis, we included *cox1* haplotype data from *S haematobium*, *S bovis*, and hybrids that were available from the National Center for Biotechnology Information database together with unpublished data from *S bovis* from Spain and Africa (personal communication with AO and BLW). We inferred the genealogical associations between haplotypes with PopART and we created minimum spanning networks to visualise the genealogical associations between the haplotypes. We inferred evolutionary associations between the haplotypes with Mega version 5.2.2, using the neighbour-joining, maximum parsimony and minimum evolution, maximum likelihood methods with the best fit evolution model (HKY+G), which we established with the Akaike information criterion (AIC) implemented in jModelTest version 3.7²⁶. Analyses were subjected to 1000 bootstraps to infer the reliability of the branches, and topologies were rooted to a single sister species haplotype (*S bovis* for *S haematobium* and *S haematobium* for *S bovis*).

Host-parasite compatibility testing

107 randomly selected *B truncatus* snails (3–5 mm in size) collected in the Cavu River were individually exposed to one, two, or three miracidia that had been successfully hatched from the urine sample of a locally infected Corsican patient referred to as patient number 12 (table 1). Patient 12 was alone in excreting enough eggs for the snail exposure tests and technical constraints prevented us from using miracidia from any other patients. The number of exposed snails that became infected was recorded and eight laboratory hamsters were each exposed to pools of 400 cercariae. Animals were killed 12 weeks after parasite exposition in accordance with standard procedures.²⁷ We used the same molecular methods as described earlier to molecularly characterise 20 female and 21 male worms recovered from these animals. All experiments on animals were done at the FR-69 WHO collaborating laboratory under permit number A66040, received from both the French Ministry of Agriculture and Fishing and the French Ministry of National Education, Research and Technology (Décret #87–848 du 19 Octobre 1987;

	Sequence identification		mtDNA <i>cox1</i> haplotype code*	Genetic profile†
	rDNA ITS	mtDNA <i>cox1</i>		
Patient 1				
3 eggs	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb2	Hybrid
1 egg	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShB	<i>S h</i>
Patient 2				
1 egg	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShD	<i>S h</i>
1 egg	<i>S bovis</i>	<i>S bovis</i>	Sb2	<i>S b</i>
Patient 3				
2 eggs	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb2	Hybrid
Patient 4				
7 miracidia	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShB	<i>S h</i>
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShC	<i>S h</i>
Patient 5‡				
8 miracidia	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShA	<i>S h</i>
Patient 6‡				
8 miracidia	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShA	<i>S h</i>
Patient 7				
1 egg	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb1	Hybrid
2 eggs	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb2	Hybrid
1 egg	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb3	Hybrid
Patient 8				
6 miracidia	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShD	<i>S h</i>
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShE	<i>S h</i>
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShF	<i>S h</i>
Patient 9				
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb4	Hybrid
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb5	Hybrid
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb6	Hybrid
7 miracidia	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShD	<i>S h</i>
Patient 10§				
5 miracidia	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb2	Hybrid
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb7	Hybrid
Patient 11§				
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S haematobium</i>	ShD	<i>S h</i>
6 miracidia	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb2	Hybrid
1 miracidium	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb8	Hybrid
Patient 12				
5 miracidia	<i>S haematobium</i>	<i>S bovis</i>	Sb2	Hybrid

Numbers of eggs or miracidia are the number successfully profiled, rather than the number extracted. Of the 12 patients, patients 1–6 were tourists and 7–12 were Corsican locals. rDNA=ribosomal DNA. mtDNA=mitochondrial DNA. ITS=internal spacer region. *S haematobium*=*Schistosoma haematobium*. *S bovis*=*Schistosoma bovis*. *S h*=pure *S haematobium*. *S b*=pure *S bovis*. Hybrid=*S haematobium*–*S bovis* hybrids. *The mtDNA *cox1* haplotype codes for each genetic type. †Genetic profile identifies the type of infection. ‡Patients from the same family. §Patients from the same family.

Table 1: Genetic profiles of individual eggs or miracidia

authorisation number 007083). Animals were maintained and cared for in accordance with the ethical requirements of French Government.

Role of the funding source

The funder of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

A total of 3544 *B truncatus* snails were collected from the nine sites on the Cavu River, but none produced schistosome cercariae. The first *B truncatus* were found 800 m from the river mouth at site 2 (figure 1). The distribution of the snails was not random ($\chi^2=8812$, $p<0.0001$), with most snails collected at sites 8 (1653 snails) and 9 (1650 snails).

Two families with one infected member each, one family with two infected members and one family with three infected members, all of which had been on holiday in Corsica in 2013 and we were able to be contacted, provided holiday photographs of their visits to the Cavu River. These together with testimonials from all 26 local Corsican patients enabled identification of the potential freshwater sources of infection. Of the nine snail sampling sites, five had been visited by the infected patients (sites 5–9, appendix p 3). All of the personal photographs from the four tourist families were of site 9 (figure 1; appendix p 3), which was the most frequented site with 12 of the 26 local Corsican patients having only frequented this site. Similarly, four local patients only had water contact at site 8. The ten remaining patients had visited several sites, mostly including sites 8 or 9. These results suggest that sites 8 and 9 were the main sources of infection. Additionally, these suspected sites of infection presented the highest abundance of snails (figure 1). Three cows and 31 goats local to the Cavu River were serologically tested, but none were positive for schistosome infection.

A total of 137 eggs or miracidia were obtained from urine samples from 12 infected patients (six locals and six tourists). Complete sequence data were successfully obtained from 73 eggs or miracidia. The *cox1* sequences were identified as being either *S haematobium* or *S bovis* (table 1). All ITS sequences except one, which was *S bovis*, were *S haematobium* and no double peaks were seen in the chromatograms at the four polymorphic positions between *S haematobium* and *S bovis*.^{15,16} Four patients produced only *S haematobium*–*S bovis* hybrids, four produced pure *S haematobium*, three produced both hybrid and pure *S haematobium* parasites, and one produced both an *S haematobium* egg and a pure *S bovis* egg (table 1).

We identified six unique *S haematobium cox1* haplotypes (table 2) and eight unique *S bovis cox1* haplotypes (table 3). 15 of the 73 samples had the *S haematobium* haplotype that we termed ShD, which was identical to the

	Number of eggs or miracidia	cox1 sequence position mutations									
		184	201	213	241	252	463	574	597	773	839
ShD	15	C	G	A	G	G	G	G	T	G	G
ShB	8	T	A
ShA	16	A	A
ShC	1	T	A	A
ShE	1	A	A	A
ShF	1	C

S haematobium sequences are compared with haplotype ShD, which is also the most common and dominant *S haematobium* haplotype throughout Africa.

Table 2: *cox1* polymorphic site mutations within the different *Schistosoma haematobium* haplotype sequences

	Number of eggs or miracidia	cox1 sequence position mutations											
		147	199	207	358	474	623	626	633	758	773	787	811
Sb2	24	G	T	G	G	G	G	G	C	G	G	G	G
Sb1	1	A
Sb3	1	A	..
Sb4	1	..	C	A	A
Sb5	1	A
Sb6	1	T
Sb7	1	A	A
Sb8	1	A	A	A

S bovis sequences are compared with the most common *S bovis* haplotype (Sb2).

Table 3: *cox1* polymorphic site mutations within the different *Schistosoma bovis* haplotype sequences

haplotype that is the most dominant and common haplotype in Africa.²⁸ The minimum spanning haplotype network (figure 2) shows the dominance of haplotype ShD as a central point from which the other five *S haematobium* haplotypes branch off by one or two mutational steps. These mutations do not form a network and are non-synonymous, suggesting that they are random mutations that do not persist in the population. The five other haplotypes (ShA, ShB, ShC, ShE, ShF) cluster closely with the *S haematobium* haplotypes from the African mainland (figure 2; appendix p 4). For *S bovis*, 23 of the samples formed a unique haplotype, Sb2, and the minimum spanning haplotype network analysis shows the dominance of this haplotype as a central point from which all of the other haplotypes branch off by one or two steps. Like the *S haematobium* haplotypes, the *S bovis* haplotypes do not form a network and the mutations are non-synonymous, suggesting that they are random mutations that do not persist in the population (figure 3). The most dominant *S bovis* haplotype, which we called Sb2, is identical to the *S bovis* haplotype obtained from two humans infected with *S haematobium*–*S bovis* hybrids in Senegal.¹⁵ The network analysis and phylogenetic analysis show the human *S bovis cox1* haplotypes (Corsica and Senegal) clustering together and

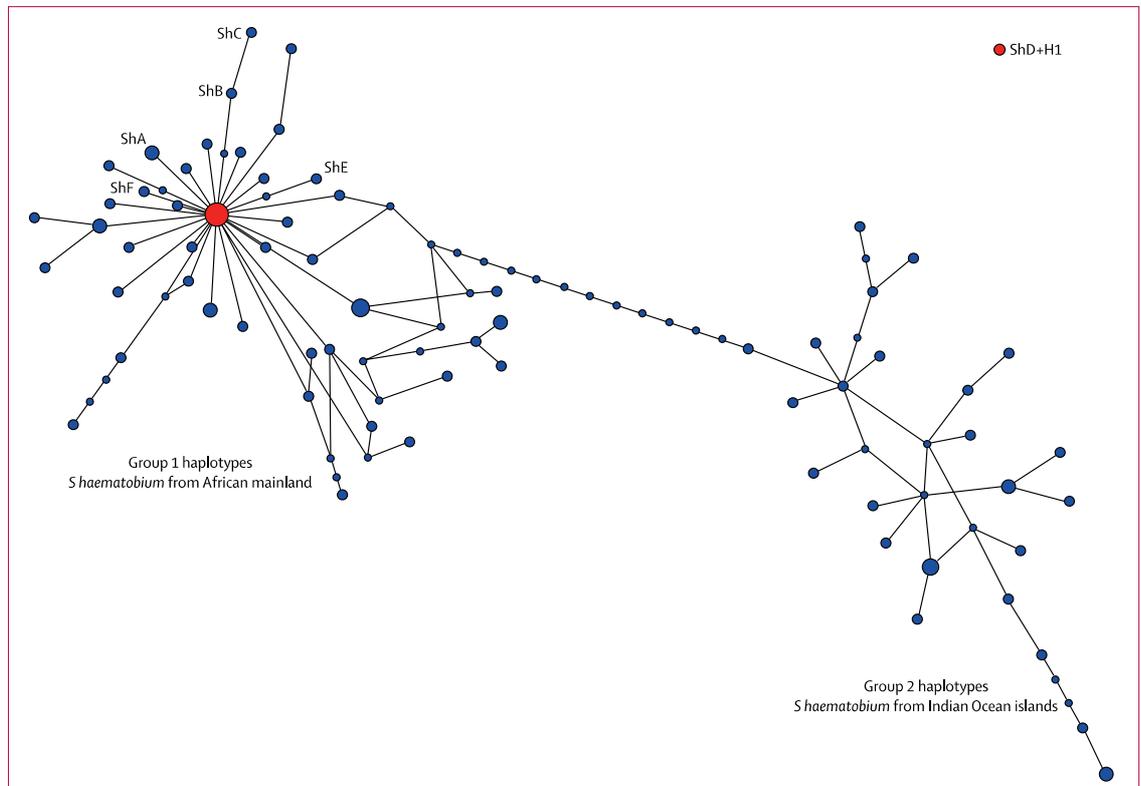


Figure 2: *Schistosoma haematobium* mitochondrial DNA *cox1* haplotype network
 Corsican *S haematobium* haplotypes are ShA, ShB, ShC, ShD, ShE, and ShF. H1 is a monophyletic group defined previously.²⁸ Our data were compared with available *S haematobium* *cox1* haplotype. *cox1*=mitochondrial cytochrome oxidase subunit I.

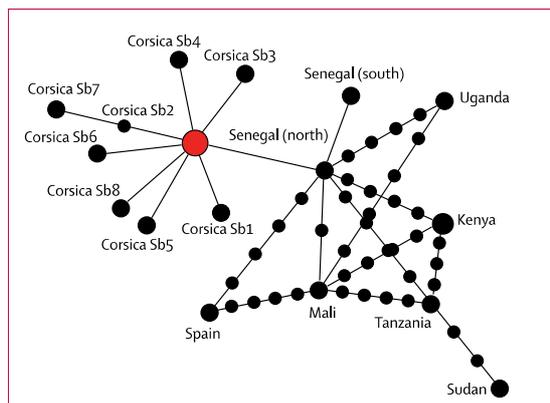


Figure 3: *Schistosoma bovis* mitochondrial DNA *cox1* haplotype network
 Our data were compared with available *S bovis* *cox1* haplotype data (appendix p 2). *cox1*=mitochondrial cytochrome oxidase subunit I.

away from the animal *S bovis* haplotypes (figures 3, 4), providing strong evidence for a close genetic relationship between the schistosomes identified in Corsica and those from west Africa, specifically Senegal.

17 of the *B truncatus* snails from Corsica became infected after exposure to the schistosomes from Corsica

(table 4). Cercariae resulting from these infections were able to successfully infect seven laboratory hamsters. We recovered 20 female and 21 male worms from the infected animals, which were molecularly characterised. All worms presented a hybrid genetic profile consisting of *S bovis* mitochondrial (mt)DNA *cox1* (haplotype Sb2) and the *S haematobium* nuclear rDNA ITS region.

Discussion

Our study identified two main infection foci along the Cavu River and showed that locally collected snails were compatible with the schistosomes from the infected patients. Molecular analyses allowed us to identify the hybrid status of the parasite and to infer the origin of the outbreak. Our results show the ease with which the schistosomes were able to invade and persist in a non-endemic area and the potential risk of dissemination of urogenital schistosomiasis to other southern European areas where suitable intermediate snail hosts are endemic, greatly facilitated by humans travelling from endemic areas to non-endemic areas.

During the 20th century, urogenital schistosomiasis became endemic in the southern Portuguese province of Algarve.²⁹ The first cases were recorded in 1921 and

transmission is estimated to have ceased in the early 1970s. The origin of this outbreak is unknown, but it was postulated that the schistosomes were introduced by people travelling from either Morocco or a former Portuguese colony in Africa (eg, Angola, Mozambique, or Guinea Bissau). One important difference between transmission in Corsica and in Portugal is the intermediate snail host. Whereas *B truncatus* is assumed to be the intermediate snail host in Corsica, in Portugal, *Planorbarius metidjensis* snails (not present in Corsica) were found to be naturally infected with schistosomes at the time of the outbreak and were therefore proposed as the intermediate host responsible for the schistosomiasis transmission.³⁰ This finding was unexpected because *P metidjensis* is not a typical host for *S haematobium* and schistosomes are known to be highly specific for their intermediate snail hosts. One explanation for the involvement of *P metidjensis* in the urogenital schistosomiasis outbreak in Portugal could have been the transmission of *S haematobium*–*S bovis* hybrids instead of pure *S haematobium*. Molecular tools for precise species identification were not available at that time so the infection was assumed to be due to infection with *S haematobium*, although this could not be verified. This hypothesis is supported by the fact that *S bovis* has been identified as using *P metidjensis* as a natural intermediate snail host in the Iberian Peninsula³¹ and hybridisation between *S haematobium* and *S bovis* could make the resultant hybrid compatible with *P metidjensis*. Schistosome hybridisation has been shown to widen the range of invertebrate hosts, with hybrid progeny inheriting the ability to develop in the specific intermediate snail hosts of both parental species.³² Further experimental crosses between *S haematobium* and *S bovis* are needed to assess the compatibility of the resulting progeny with *B truncatus*, *P metidjensis*, or both. Such experiments would allow the range of snail hosts of these hybrid schistosomes to be established and further clarify the risk of spread and introduction of these parasites into other European countries.

Unfortunately we found no patent-infected snails in the Cavu River, which is not surprising because the prevalence of naturally infected snails is normally very low.³³ However, we only screened for active patent infections, and additional methods to detect pre-patent infections, such as PCR,³⁴ should be considered in future studies. We did compatibility experiments to investigate the role of the endemic *B truncatus* in the Corsican outbreak. Our findings showed that there is high compatibility between the endemic snails and the schistosomes isolated from the infected patients, confirming their ability to be an intermediate snail host and supporting their role in transmission.

The molecular analysis of the Corsican schistosomes shows a close genetic relationship with schistosomes previously isolated from northern Senegal, suggesting a west African origin for the schistosomes in Corsica.

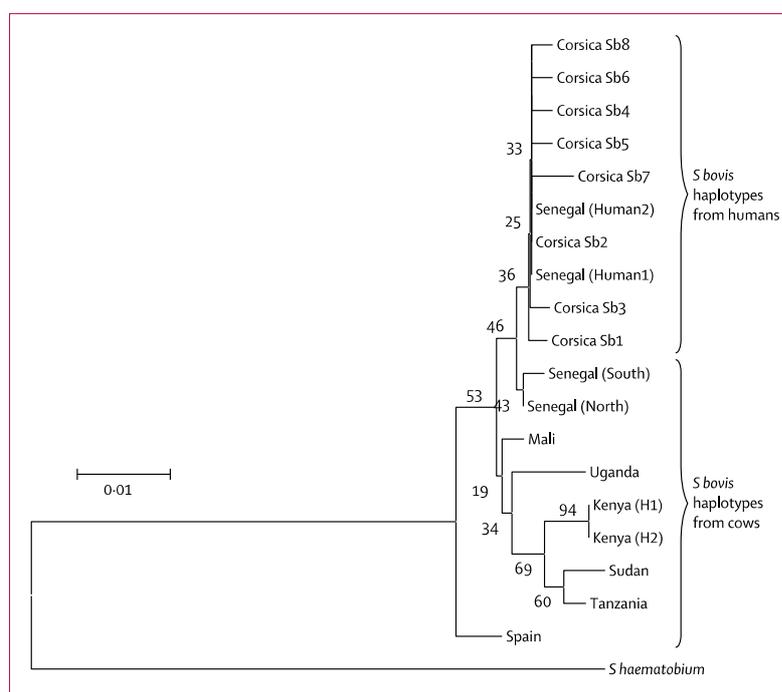


Figure 4: Phylogenetic tree of *Schistosoma bovis* mitochondrial DNA *cox1* haplotypes
Our data were compared with available *S bovis* *cox1* haplotype data (appendix p 2). *cox1*=mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1.

	Number of exposed snails	Number of surviving snails	Number of infected snails	Prevalence of infection
1 miracidium	24	18	3	17%
2 miracidia	48	48	6	13%
3 miracidia	35	34	8	24%

Infections performed on snails collected in the Cavu River with schistosomes recovered from a single patient identified as patient 12. Infection was confirmed by natural cercarial emission at 48 days post exposure.

Table 4: Experimental infection of *Bulinus truncatus* snails

S haematobium is endemic in 53 countries,³⁵ and urogenital schistosomiasis is highly endemic across Senegal, with prevalence estimated around 25% of the total population, but ranging between 0% and 100% according to the region.³⁶ Senegal was a French colony until 1958, but important ties remain between France and Senegal. Nationals travel freely between both countries and Senegal is a popular tourist destination for French nationals. French tourists can become infected in Senegal and infections are often reported in European travellers.^{37,38} Individuals might not know that they are infected and could introduce the parasite into places such as Corsica. Emigration from Senegal to Europe is frequent, with France remaining the most common destination.³⁹ Senegalese nationals travelling legally to Corsica for summer work is common, creating an opportunity for

the accidental importation of African schistosomes. The Cavu River, an ideal habitat for *B truncatus*, is particularly attractive for recreational bathing or swimming, enabling the spread of urogenital schistosomiasis by infected people urinating in the freshwater pools. Corsica is visited by 3 million tourists every year, including 2.7 million in the high season between May and October.⁴⁰ During the peak of the tourist season (from mid-July to mid-August) 3000–5000 people visit the Cavu River every day. These high visitor numbers, combined with the high abundance of suitable intermediate snail hosts and people travelling between Corsica and urogenital schistosomiasis-endemic areas, makes the Cavu River a high-risk area for the introduction and transmission of urogenital schistosomiasis.

In a previous report, we showed that a 12-year-old German boy who visited Corsica in 2013¹⁹ was exclusively excreting *S haematobium*–*S bovis* hybrid schistosomes.²³ Our present study includes data from 12 additional patients and depicts a more complex situation. These patients excreted both pure *S haematobium* and *S haematobium*–*S bovis* hybrids, which is common in Senegal.^{15,16} Additionally, to our knowledge, we have detected the first pure *S bovis* genotype from a human patient, suggesting that this patient was infected with pure *S bovis* schistosomes. Since *S bovis* is deemed to be a parasite of domestic livestock, this finding presents the first potential evidence for the zoonotic transmission of *S bovis*. However, existing genotyping tools are limited in that we have used only two genes for hybrid identification and the nuclear genetic profiles can be affected by hybrid backcrossed generations, which would silence the genetic signal from one of the parental species.¹⁵ More genetic data are needed to fully elucidate whether this was a true case of zoonotic infection. Additionally, *S bovis* is an intestinal schistosome, which runs counter to the notion that this is a pure zoonotic infection because these schistosomes were excreted in urine. Unlike the previous studies from Senegal, we did not see double chromatogram peaks in the nuclear ITS sequences at the polymorphic sites separating *S bovis* and *S haematobium*. This suggests that the Corsican hybrids are not first-generation hybrids resulting from *S haematobium* and *S bovis* schistosomes being dually transmitted in Corsica and mating within the infected patients,¹⁵ but are instead a result of the direct introduction of *S haematobium*–*S bovis* hybrids into Corsica alongside pure *S haematobium*. This idea is further supported by the fact that we found no infected livestock in the area.

B truncatus has a much wider distribution than its compatible schistosome species. These snails are endemic in southern Europe, including Spain, Italy, France, and Greece. Mean water temperatures are expected to increase in the south of Europe,⁴¹ which will enhance the survival and fitness of both the parasite and snail populations. Given the recent increase in migration from endemic areas across some of these regions,

together with parasite genetic variants, the spread of parasite species becomes a real risk. This risk warrants further investigation, but also needs to be brought to the attention of European governments. Furthermore the findings from this study and all the other reports about urogenital schistosomiasis infection in Corsica, show how easily this form of schistosomiasis can spread even where good hygiene and sanitation practices are in place. Additionally the findings raise concerns as to how the transmission of urogenital schistosomiasis can be controlled, even in developed settings, which will hamper goals set to achieve elimination in endemic areas within the near future.⁴²

Contributors

JB, BLW, and TH wrote the manuscript. ET, GMo, HM, DR, SM-C, and GMi revised the manuscript. JB, SG-A, JF, JK-S, AR, RG, and HB-C did the malacological survey. SG-A collected animal blood samples. J-FA did the molecular analyses. AO did ELISA tests. JB, GMi, and RH questioned patients along the Cavu River. AB and HN supplied parasite samples. JB and AR did the experimental infections. BLW did the phylogenetic and phylogeographic analyses.

Declaration of interests

We declare no competing interests.

Acknowledgments

This study was financially supported by WHO, ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), and UPVD (University of Perpignan Via Domitia). Spanish collaboration was funded by Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET; number RD12/0018/0013 of the VI PN de I+D+I 2008-2011, ISCIII-Sub dirección General de redes temáticas de investigación cooperativa en salud (RETICS)) and the Ministry of Health and Consumption (Madrid, Spain). We thank Pierre Marty from CHU de Nice (Nice, France) and all members the Bilharziasis expert group of ANSES. We also thank Françoise Alluin and all the members of the 2A2B laboratory (Porto-Vecchio, France).

References

- Bouid M, Colón-González FJ, Lung T, Lake IR, Hunter PR. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. *BMC Public Health* 2014; **14**: 781.
- Schaffner F, Fontenille D, Mathis A. Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirosis in Europe. *Lancet Infect Dis* 2014; **14**: 1044.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 2007; **370**: 1840–46.
- Gould EA, Gallian P, De Lamballerie X, Charrel RN. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 1702–04.
- Rollinson D, Stothard JR, Southgate VR. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. *Parasitology* 2001; **123** (suppl): S245–60.
- Rollinson D. A wake up call for urinary schistosomiasis: reconciling research effort and public health importance. *Parasitology* 2009; **136**: 1593–610.
- King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet* 2005; **365**: 1561–69.
- van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 2003; **86**: 125–39.
- Shiff C, Veltri R, Naples J, et al. Ultrasound verification of bladder damage is associated with known biomarkers of bladder cancer in adults chronically infected with *Schistosoma haematobium* in Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; **100**: 847–54.

- 10 Kjetland EF, Norseth HM, Taylor M, et al. Classification of the lesions observed in female genital schistosomiasis. *Int J Gynaecol Obstet* 2014; **127**: 227–28.
- 11 Rollinson D, Simpson AJG. The biology of Schistosomes. From genes to latrines. London: Academic Press, 1987.
- 12 De Bont J, Vercruyse J. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitol Today* 1997; **13**: 255–62.
- 13 Brumpt E. Cycle évolutif du *Schistosoma bovis* (*Bilharzia crassa*); infection spontanée de *Bulinus contortus* en Corse. *C R Acad Sci III* 1929; **CLXXXI**: 879.
- 14 Grétilat S. Epidémiologie de certaines affections à trématodes des animaux domestiques en Corse (Bilharziose bovine et distomatose bovine et ovine). *Ann Parasitol Hum Comp* 1963; **38**: 471–81.
- 15 Webster BL, Diaw OT, Seye MM, Webster JP, Rollinson D. Introgressive hybridization of *Schistosoma haematobium* group species in Senegal: species barrier break down between ruminant and human schistosomes. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; **7**: e2110.
- 16 Huyse T, Webster BL, Geldof S, et al. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathog* 2009; **5**: e1000571.
- 17 Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Jourdane J, Webster BL, Vercruyse J. *Schistosoma intercalatum*: an endangered species in Cameroon? *Trends Parasitol* 2003; **19**: 389–93.
- 18 Berry A, Moné H, Iriart X, et al. *Schistosomiasis haematobium*, Corsica, France. *Emerg Infect Dis* 2014; **20**: 1595–97.
- 19 Holtfreter MC, Moné H, Muller-Stover J, Mouahid G, Richter J. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Euro Surveill* 2014; **19**: 20821.
- 20 Boissier J, Moné H, Mitta G, Bargues MD, Molyneux D, Mas-Coma S. Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infect Dis* 2015; **15**: 757–58.
- 21 Doby JM, Rault B, Deblock S, Chabaud A. Snails and bilharziasis in Corsica. Distribution, frequency and biology of *Bulinus truncatus*. *Ann Parasitol Hum Comp* 1966; **41**: 337–49 (in French).
- 22 Berry A, Fillaux J, Martin-Blondel G, et al. Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Euro Surveill* 2016; **21**: 3.
- 23 Mone H, Holtfreter MC, Allienne JF, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol Res* 2015; **114**: 4127–33.
- 24 de la Torre-Escudero E, Manzano-Roman R, Perez-Sanchez R, Barrera I, Siles-Lucas M, Oleaga A. Molecular cloning, characterization and diagnostic performance of the *Schistosoma bovis* 22.6 antigen. *Vet Parasitol* 2012; **190**: 530–40.
- 25 Beltran S, Galinier R, Allienne JF, Boissier J. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 2008; **103**: 501–03.
- 26 Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; **25**: 1253–56.
- 27 Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 2003; **91**: 144–50.
- 28 Webster BL, Emery AM, Webster JP, et al. Genetic diversity within *Schistosoma haematobium*: DNA barcoding reveals two distinct groups. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; **6**: e1882.
- 29 De Azevedo JF, Da Silva JB, Matos Coito A, Coelho MF, Colaco A. O foco Português de schistosomiase. *An Inst Med Trop (Lisb)* 1948; **5**: 175–221.
- 30 Bettencourt A, Borges I. Le *Planorbis metidjensis*, hôte intermédiaire du *Schistosoma haematobium* au Portugal. Confirmation expérimentale. *C R Soc Biol* 1922; **87**: 1039–40.
- 31 Moné H, Mouahid G, Morand S. The distribution of *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 in relation to intermediate host mollusc-parasite relationships. *Adv Parasitol* 1999; **44**: 99–138.
- 32 Webster BL, Southgate VR. Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology* 2003; **127**: 231–42.
- 33 Basch PF. Schistosomes. Development, reproduction, and host relations. New York: Oxford University Press, 1991.
- 34 Hamburger J, Hoffman O, Kariuki HC, et al. Large-scale, polymerase chain reaction-based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection. *Am J Trop Med Hyg* 2004; **71**: 765–73.
- 35 Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000; **77**: 41–51.
- 36 Schur N, Hurlimann E, Garba A, et al. Geostatistical model-based estimates of Schistosomiasis prevalence among individuals aged ≤20 years in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; **5**: e1194.
- 37 Blach O, Rai B, Oates K, Franklin G, Bramwell S. An outbreak of schistosomiasis in travellers returning from endemic areas: the importance of rigorous tracing in peer groups exposed to risk of infection. *J Public Health (Oxf)* 2012; **34**: 32–36.
- 38 Steiner F, Ignatius R, Friedrich-Jaenicke B, et al. Acute schistosomiasis in European students returning from fieldwork at Lake Tanganyika, Tanzania. *J Travel Med* 2013; **20**: 380–83.
- 39 Gerdes F. Focus Migration. Country profile: Senegal, No 10, Nov 2007. Hamburg: Hamburg Institute of International Economics, 2007.
- 40 Agence du Tourisme de la Corse. Observation et stratégie touristiques 2013. <http://www.bastia.aeroport.fr/Administration/accueil/pdf/pdfdoss20121227141029.pdf> (accessed May 2, 2016).
- 41 van Vliet MTH, Vodele S, Rubbelke D. Water constraints on European power supply under climate change: impacts on electricity prices. *Environ Res Lett* 2013; **8**: 1–10.
- 42 Rollinson D, Knopp S, Levitz S, et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop* 2013; **128**: 423–40.

2) Séquençage complet du génome de l'hybride, analyse du niveau d'introgession et caractérisation morphologique

- **Publication : Julien Kincaid-Smith^{1¶}, Alan Tracey^{2¶}, Ronaldo Augusto¹, Ingo Bulla^{1, 3, 4}, Nancy Holroyd², Anne Rognon¹, Olivier Rey¹, Cristian Chaparro¹, Ana Oleaga⁵, Santiago Mas Coma⁶, Jean-François Allienne¹, Christoph Grunau¹, Matthew Berriman², Jérôme Boissier^{1*} and Eve Toulza^{1*}. Whole genome sequencing and morphological analysis of the human-infecting schistosome emerging in Europe reveals a complex admixture between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites. (Soumis à the Lancet Infectious Disease)**

La méthode de diagnostic standard utilisée pour identifier les schistosomes est basée sur la collecte d'œufs du parasite via l'urine ou les fèces des patients. En fonction de la voie d'excrétion on peut déterminer s'il s'agit de l'espèce urogénitale (*S. haematobium*) ou d'autres espèces mésentériques et rectales (principalement *S. mansoni* chez l'homme). La morphologie des œufs est typique d'une espèce et permet de préciser le diagnostic. En Corse les œufs ont été recherchés uniquement dans l'urine des patients infectés et présentaient deux morphotypes, avec i) une forme ronde à ovale typique des œufs de *S. haematobium*, et ii) une forme intermédiaire (allongée et losangique) non typique de *S. haematobium* (Moné et al. 2015). Cependant il existe une forte discordance entre les phénotypes habituellement utilisés pour l'identification des espèces (forme de l'œuf) et les génotypes («hybride» ou «pur») qu'il s'agisse d'infections en Corse ou en l'Afrique (Boon et al. 2017) La forme des œufs n'est donc pas toujours un bon indicateur de l'espèce et ne permet pas la détection d'hybrides. La seconde méthode couramment utilisée pour identifier les espèces de schistosomes est d'ordre moléculaire mais repose seulement sur deux gènes comme nous l'avons vu précédemment (COI et ITS2). Elle permet de caractériser les individus comme étant « purs » ou « hybrides », cependant il s'agit d'une simplification de la réalité pouvant mener à de faux négatifs notamment parce-que la recombinaison et les événements de reproduction successifs entre hybrides et / ou hybrides et individus « purs » peuvent conduire à une congruence partielle entre ces deux gènes. De plus, le génome nucléaire est représenté par un seul gène et ne peut apporter d'informations sur le nombre de générations (sauf la première en présence d'un double pic), ni indiquer les niveaux d'introgession génomique des hybrides. Après avoir caractérisé le schistosome hybride Corse à partir de ces deux marqueurs discordants (voir publication précédente), nous avons donc voulu déterminer la perméabilité du génome de ces deux espèces de schistosomes aux

allèles de l'espèce opposée. Aucune étude à notre connaissance ne quantifie les niveaux d'introgession génomique de pathogènes hybrides, pourtant cette information est essentielle afin de mieux comprendre les traits d'histoire de vie de ces organismes. Nous avons analysé la composition génomique de cet hybride grâce à un séquençage global du génome des parasites adultes et avons caractérisé certains traits d'histoire de vie du parasite (morphologie des œufs et adultes et la compatibilité du parasite avec les hôtes intermédiaires des deux espèces parentales). Ce travail nous a permis pour la première fois de mettre en évidence un mélange complexe entre les génomes des espèces parentales avec 77% des séquences d'origine *S. haematobium* et 23 % d'origine *S. bovis*. Ce travail donne un nouvel aperçu du phénomène d'hybridation au sein des schistosomes et des pathogènes en général en suggérant de multiples rétrocroisements et une origine ancienne de l'hybridation. Ce mélange de gènes entre espèces soulève un certain nombre de questions concernant le rôle de l'hybridation dans l'émergence de la maladie en Europe et plus généralement la virulence et capacité invasive de tels parasites.

bioRxiv preprint first posted online Aug. 11, 2018; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/387969>. The copyright holder for this preprint (which was not peer-reviewed) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under a [CC-BY-NC-ND 4.0 International license](#).

Whole genome sequencing and morphological analysis of the human-infecting schistosome emerging in Europe reveals a complex admixture between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites.

Julien Kincaid-Smith^{1¶}, Alan Tracey^{2¶}, Ronaldo Augusto¹, Ingo Bulla^{1, 3, 4}, Nancy Holroyd², Anne Rognon¹, Olivier Rey¹, Cristian Chaparro¹, Ana Oleaga⁵, Santiago Mas-Coma⁶, Jean-François Allienne¹, Christoph Grunau¹, Matthew Berriman², Jérôme Boissier^{1*} and Eve Toulza^{1*}

¹Univ. Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, Perpignan, France.

²Wellcome Sanger Institute, Wellcome Genome Campus, Hinxton, CB10 1SA, Hinxton, United Kingdom.

³Institute for Mathematics and Informatics, University of Greifswald, Greifswald, Germany.

⁴Department of Computer Science, ETH Zürich, Zürich, Switzerland.

⁵Parasitology Laboratory, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, Spain.

⁶Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia, Spain.

¶ These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors

eve.toulza@univ-perp.fr

boissier@univ-perp.fr

Abstract

Background: Schistosomes cause schistosomiasis, the world's second most important parasitic disease of public health importance after malaria. A peculiar feature of schistosomes is their ability to hybridize. So far, individual hybrid schistosomes are considered as such when they display incongruent genetic signatures at a nuclear (ITS-2) and a mitochondrial (COI) gene. Nevertheless, the introgression levels of any *Schistosoma* hybrid have never been assessed at the whole genome level. Here we have analysed both the morphological characteristics and the genomic composition of the schistosome that infected over one hundred humans in Corsica during summer 2013. This parasite was determined as a hybrid between the ruminant-infective (*Schistosoma bovis*) and the human-infective (*Schistosoma haematobium*) schistosomes. Characterizing precisely the genomic introgression of these hybrids is essential to better understand their life history traits, and the disease dynamics and epidemiology *in natura*.

Results: For this work, we first performed genome assembly improvement and annotation of *S. bovis*. Whole genome sequencing of the European hybrid revealed that this parasite is strongly introgressed and composed of 77% of sequences of *S. haematobium* origin, and 23% of *S. bovis* origin. We also present the morphological characterization of adult hybrids, and compatibility with their potential vector snails.

Conclusions: For the first time since the discovery of hybrid schistosomes, these results reveal at the whole genomic level a complex admixture of parental genomes highlighting (i) the high permeability of schistosomes to other species' alleles, and (ii) the importance of hybrid formation for pushing species boundaries not only conceptually but also geographically.

Keywords: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis*, Hybridization, Genomic Introgression, Whole Genome Next Generation Sequencing

Background

Hybridization is where the genomes of two distinct species are brought together in one individual. By definition, hybridization between individuals from two previously reproductively isolated species is expected to produce offspring less fit than the parents, sometimes infertile or even sterile. In some cases, however, hybridization leads to new non-detrimental phenotypes [1–3]. First-generation fertile hybrids have 50% of each parental genome and successive reproduction events between the resulting hybrids, or between hybrids and individuals from the parental species, progressively lead to a widespread invasion of one genome by the other. Such genomic introgression might have important consequences on the evolutionary outcomes depending on the adaptive value of the resulting new genomic combinations [4]. When hybrid individuals display greater fitness than individuals from the parental species, a phenomenon known as hybrid vigour (or heterosis; [5–7]), some species can be supplanted by the emerging hybrids and ultimately become extinct [8]. Alternatively, although non-exclusively, some advantageous combinations of parental genes in the hybrid offspring may allow progeny to switch and adapt to new environments compared to the parental species. Such niche shifts together with selection against reproduction between hybrids and the parental species can ultimately lead to speciation, a process called “speciation by hybridization” [9–12].

Global changes, both anthropogenic and environmental modifications, may contribute to modifications in the geographical distribution of species and expand their potential ecological niches [13,14]. Populations of genetically distinct species may thus acquire a new capacity to interact, and enhanced contact between them may allow them to hybridize and subsequently introgress their genomes by backcrossing with parental species or other hybrids. This phenomenon called “hybrid swarm” has mainly been evidenced in plant species [15]. Generally, hybridization has been well described in plants, and for a long time it was considered a rare “mistake” in the reproductive isolation mechanisms of animals [16]. Today, with the advances in the development of molecular tools, and an integrative view of genetics and ecology (molecular ecology), scientists have revealed to a larger extent new cases of hybridization and introgression, both in plants and animals [4,17–24]. Surprisingly, very little attention has been given to pathogens, and particularly to metazoan parasites, that do not deviate from the rule that hybridization is more frequent than previously thought [18,21,25]. Hybridizations of human parasites are not scarce and are a real concern

in terms of parasite transmission, epidemiology and disease [18,25–27]. For instance, hybridization is evident in the parasitic worms—*Schistosoma*, *Fasciola*, *Ascaris* and *Trichinella*—and protozoa—*Plasmodium*, *Leishmania*, *Toxoplasma* and *Trypanosoma* [25,26]. Schistosomes are parasitic flatworms, responsible for the major tropical disease schistosomiasis, and known to hybridize; natural hybrids are increasingly being detected in human hosts [28]. The epidemiological statistics associated with the disease are sobering: 800 million people are at risk in 78 countries, mostly concentrated in sub-Saharan Africa; 230 million are infected and the disease causes more than 200 000 deaths each year as well as between 1.7 and 4.5 million Disability Adjusted Life Years (DALYs) [29]. The most exposed groups are children and young adults that have predominant activities linked to contaminated freshwater environments. In addition to humans, schistosomiasis severely impacts livestock in Africa and Asia where an estimated 165 million animals are infected [30].

Schistosomes have a complex life cycle that includes passage through a freshwater snail intermediate host and a final vertebrate definitive host. Hybridizations between schistosomes have been identified: (i) between different human-specific schistosome species, (ii) between different animal-specific schistosome species, (iii) and between human-specific and animal-specific schistosome species [28]. These latter hybrid forms are particularly alarming because they raise the possibility of the emergence of new zoonotic parasitic strains, introducing an animal reservoir in the disease, and therefore greatly hampering our ability to properly control the transmission.

In 2013, schistosomiasis reached Southern Europe (Corsica, France). Since then, endemic infections were recurrently identified in 2015 and 2016, clearly indicating that the parasite has settled and established locally [31]. Using two molecular markers (the nuclear Internal Transcribed Spacer II (ITS-2) and the mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I (COI)), we had previously demonstrated that the parasitic strain now well established in Corsica is a hybrid between *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* that are known to infect humans and livestock, respectively [32,33]. The emergence of a hybrid strain out of endemic areas of both parental species strongly suggest a role of hybridization in the emergence success of schistosomes in Corsica. Among the hundreds of schistosome eggs recovered from patients infected in Corsica, almost all had a classical *S. haematobium* shape [32], but using two genetic markers (ITS-2 and COI) we showed that 42% of eggs were considered hybrids, and

only 58% were considered pure *S. haematobium*. Wherever in Africa [34] or in Corsica, a clear discrepancy exists between the phenotypes usually used for species identification (egg shape) and the genotypes (“hybrid” or “pure”). Therefore, egg shape cannot be considered a good indicator for hybrid detection.

PCR amplification of the two abovementioned genes ITS-2 and the mitochondrial COI is the current method for schistosome molecular identification. Individuals having both nuclear and mitochondrial haplotypes of a unique species are considered as “pure”. Conversely, individuals that display a nuclear haplotype characteristic of one species and a mitochondrial haplotype characteristic of another species are defined as hybrid parasites. This simple diagnosis procedure may clearly lead to identification of false “pure” individuals notably because recombination and successive reproduction events between hybrids and/or hybrids and “pure” individuals may lead to a congruency between these two genes despite introgression at other genomic locations. Moreover, this method does not indicate the genomic introgression levels of hybrids (i.e., the relative hybrid genomic composition between each parental genomes). Other particular cases of hybridization can be observed with mitochondrial introgression that in extreme cases may lead to the replacement of the mitochondrial genome of one species with that of another (mitochondrial capture) [35–38]. The precise characterization of the introgression levels of hybrid populations is essential for a diagnostics purpose but is also necessary to better understand the parasite life history traits, the disease dynamics and the epidemiology in the field. Next generation whole-genome sequencing is now the tool of choice for a deeper insight into the genomic composition of natural hybrids.

In this work, our aim was to fully characterize schistosome hybrids that have recently emerged in Europe. More particularly we first describe hybrids based on morphological traits (on eggs and adults) as well as parasite compatibility for snail intermediate host. On the genome level, we characterized the extent of introgression in Corsican hybrids at the whole genome scale. To do so, we first re-sequenced the *Schistosoma bovis* genome using long reads, as the previous assembly was not sufficient for robust introgression analysis. We then developed an analytical pipeline that we validated on experimentally produced hybrids (F1) between *S. haematobium* and *S. bovis*. We found that *Schistosoma* hybrids established in Corsica display *S. haematobium* biased morphology and life history traits. These characteristics are congruent with the genome background of hybrids that was found to be

composed of 77% of *S. haematobium* and 23% of *S. bovis* genome, respectively. To our knowledge this is the first study that provides a precise whole-genome scale evaluation of the introgression levels in a parasitic hybrid strain.

Results:

- Morphological description of the eggs and adult worms

A total of 44 eggs were examined for morphological characterization. The length and width were assessed on all eggs, but the spine length have been measured on a subset of 36 that had a spine distinctive enough to allow for proper estimation of their sizes. The results are presented in Table 1. Hybrid eggs had a mean length of 126.4 μm (± 22.9 μm SD), and a mean width of 60.8 μm (± 13.0 μm SD). The mean spine length was of 8.2 μm (± 2.1 μm SD). The minimum-maximum and number of eggs analyzed for each variable are presented in Table 1.

Table 1: Morphological measurements results of the Corsican hybrid schistosome eggs (SD = Standard deviation).

	Length (including spine)	Width	Spine length
No. of eggs	44	44	36
Mean (\pm SD) in μm	126.4 (± 22.9)	60.8 (± 13.0)	8.2 (± 2.1)
Minimum in μm	73.9	40.9	3.95
Maximum in μm	170.9	92.5	13.6

Most of the eggs displayed a representative elliptical morphotypes and were characterized by a terminal spine, reminiscent of *S. haematobium* infection in humans. Nevertheless, not all eggs had a typical *S. haematobium* morphotype and in some cases they seemed intermediate with *S. bovis*-type eggs (Fig 1).



Figure 1: Egg morphologies of the pure parental species and the Corsican *S. haematobium* X *S. bovis* hybrid. Eggs 1 and 2 show typical morphologies of *S. haematobium* (elliptical with a terminal spine) and *S. bovis* (spindle shape with a terminal spine), respectively. Eggs 3-8 show the egg morphology of the Corsican hybrid schistosome. While most eggs were typical to *S. haematobium* (3-7), a high variability of morphotypes was observed (8-9).

Like other species of the genus *Schistosoma*, male and female adults of the schistosome hybrids exhibited a characteristic marked sexual dimorphism and females living in the gynaecophoric canal of male worms (Additional Fig S1). The detailed morphological characteristic measurements are presented in Table 2.

Table 2: Morphological measurements of adult Corsican hybrid male and female schistosomes

	<u>Hybrid schistosomes from Corsica</u>			
	Male		Female	
	Mean (\pm SD)	Range	Mean (\pm SD)	Range
Total length (mm)	5.3 (\pm 1.0)	3.3 – 6.6	9.6 (\pm 1.2)	8.6 – 14.1
Largest body width (mm)	0.3 (\pm 0.07)	0.2 – 0.5	0.2 (\pm 0.04)	0.1 – 0.3
Oral sucker length (mm)	0.2 (\pm 0.01)	0.2 – 0.2	0.05 (\pm 0.004)	0.04 – 0.06
Oral sucker width (mm)	0.2 (\pm 0.006)	0.1 – 0.2	0.05 (\pm 0.002)	0.05 – 0.06
Ventral sucker length (mm)	0.3 (\pm 0.008)	0.2 – 0.3	0.06 (\pm 0.001)	0.06 – 0.07
Ventral sucker width (mm)	0.3 (\pm 0.01)	0.2 – 0.3	0.06 (\pm 0.001)	0.06 – 0.07
Testes number	4.2 (\pm 0.5)	4 – 5	-	-
Ovary length (mm)	-	-	0.3 (\pm 0.01)	0.3 – 0.3
Ovary width (mm)	-	-	0.09 (\pm 0.01)	0.08 – 0.1
Extension of the vitellaria (mm)	-	-	5.0 (\pm 0.7)	4 – 5.9

The adult male parasites had an elongated body measuring 5.3 (± 1.0) mm long and 0.3 (± 0.07) mm wide at largest part of the body. The male body was dorso-ventrally flattened with folds in the ventral axis forming the gynaecophoral canal where the paired females are commonly found (Fig 2a). The anterior region was narrower than the rest of the body and presented a sub-terminal mouth formed into the oral sucker (length: 0.2 ± 0.01 mm; width: 0.2 ± 0.006 mm) and a robust ventral sucker or acetabulum (length: 0.3 ± 0.008 mm; width: 0.3 ± 0.01 mm) near the top of the gynaecophoral canal (Fig 2b). The oesophagus began at the oral sucker and was extended posteriorly to the acetabulum where it bifurcates into the gut caeca until it reunites at the posterior end of the body.

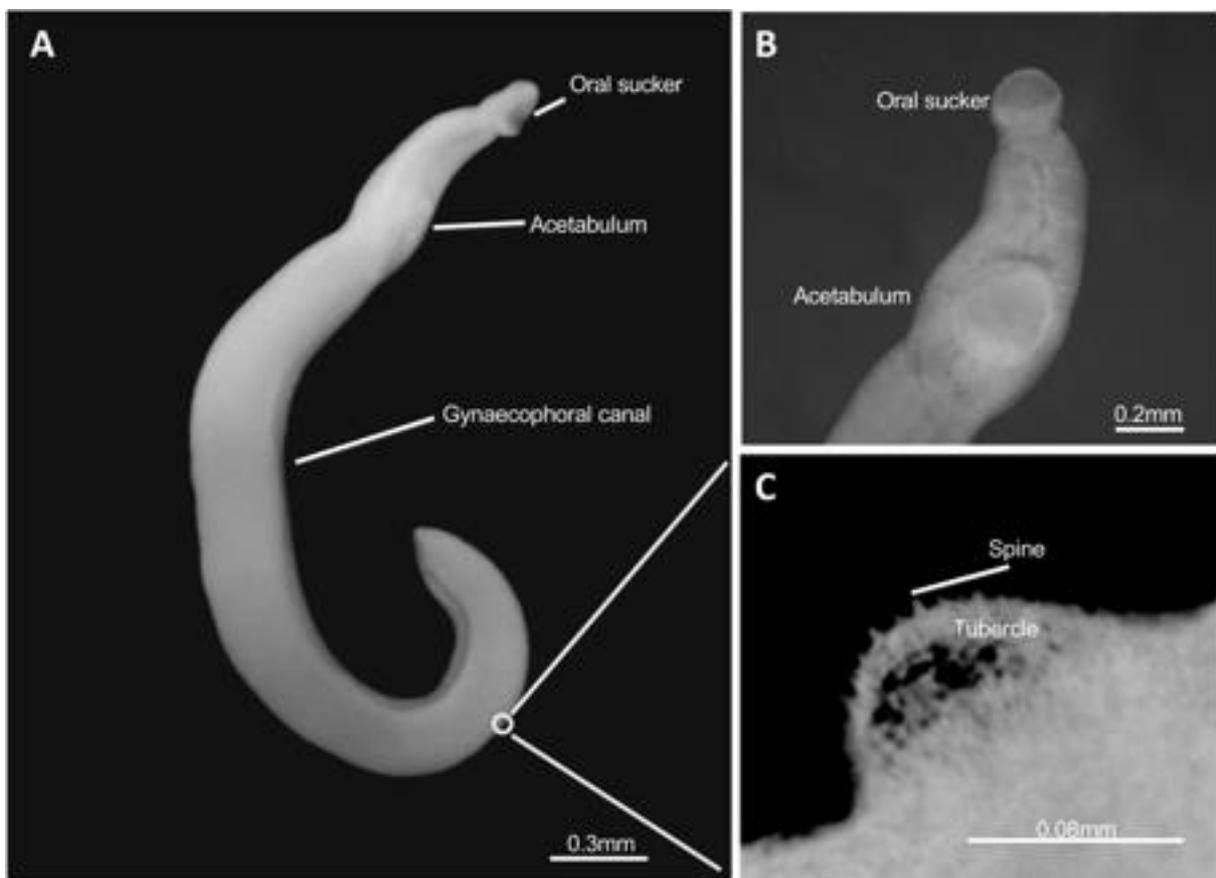


Figure 2: Morphological observations of male hybrid schistosomes from Corsica: (A) Whole parasite body locating oral sucker, acetabulum (ventral sucker) and gynaecophoral canal; (B) Frontal view of anterior region showing oral sucker, acetabulum (ventral sucker) in detail; (C) Dorso-lateral view of spines and tubercle over parasite surface in detail.

The testes, situated dorsally posterior to the ventral sucker, were round to ovoid and we found 4 to 5 in number in adult males (4.2 ± 0.5). Posterior to the acetabulum, in the dorsal region, tubercles with a round extremity began to appear at the level of the gynaecophoral canal and occurred to all the posterior region of the body (Fig 2c).

The presence of tegument projections on the tubercles were identified with several apical spines which decreased in distribution and size towards the back and sides of the male's bodies (Fig 2c). The female's bodies were elongated and filiform and measured 9.6 (± 1.2) mm long and 0.2 (± 0.04) mm wide, with the posterior half of body expanded (Fig 3a). The anterior regions were smaller compared to males, and females had a small oral sucker (length: 0.05 ± 0.004 mm; width: 0.05 ± 0.002 mm) and acetabulum (length: 0.06 ± 0.001 mm; width: 0.06 ± 0.001 mm) (Fig 3b).

The oesophagus started near the oral sucker and bifurcated immediately after the acetabulum. The genital pore was situated at the posterior of the ventral sucker (dorsally) and some eggs could be observed in the uterus (Fig.3c). A single ovary measuring 0.3 (± 0.01) long and 0.09 (± 0.01) wide was situated in the posterior third of the female's body (Fig 3a). The vitelline glands, also called vitellaria were extensive, occupying roughly 50% of the posterior part of the worm and extending further posteriorly than the intestine. The females' tegument was smooth and uniform without significant projections. The posterior extremity was tapered and rounded.

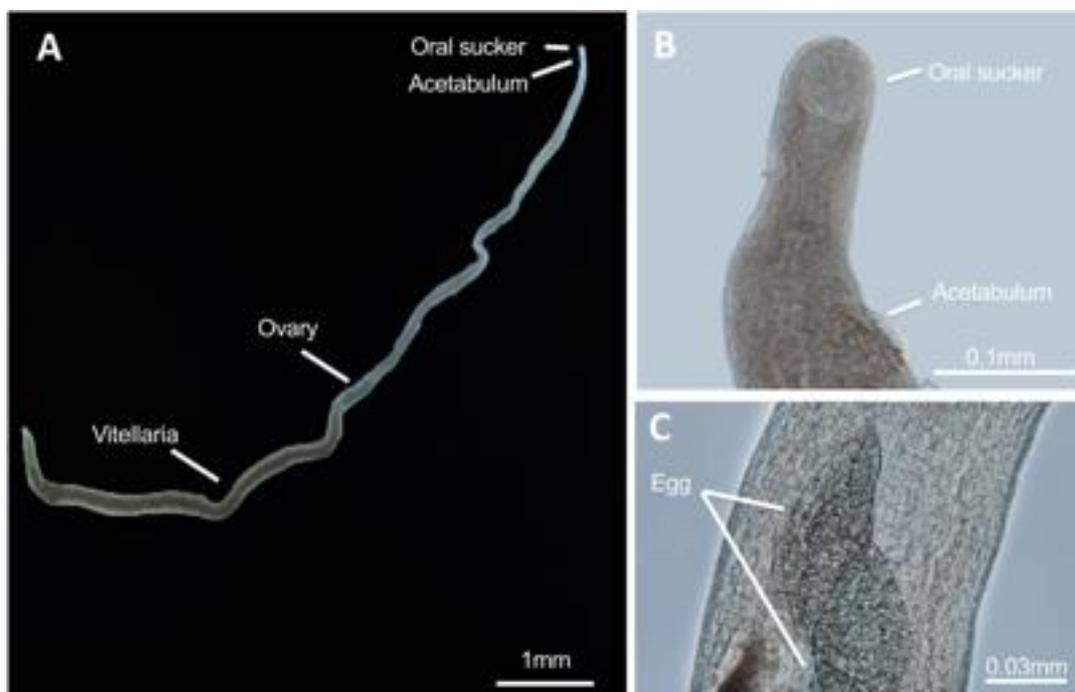


Figure 3: Morphological observations of female hybrid schistosomes from Corsica: (A) Lateral view of whole parasite body showing oral sucker, acetabulum (ventral sucker), ovary and vitellaria; (B) Frontal view of anterior region showing oral sucker, acetabulum (ventral sucker) in detail; (C) Dorso-lateral view of two eggs inside female uterus in detail.

- **Hybrid parasite compatibility with the natural hosts of the parental species, *Bulinus truncatus* and *Planorbarius metidjensis***

The susceptibility of the parental snail hosts was inferred at 35 days after exposition to 5 parasite larvae (miracidia). The prevalence in *Bulinus truncatus* was 24% (9 infected snails out of 37 alive). In *Planorbarius metidjensis*, which is a specific host to *S. bovis*, the prevalence was 0% (0 infected snails out of 29 alive).

- **Whole genome sequencing introgression level analyses**

As the previous *S. bovis* assembly was highly fragmented (111 328 scaffolds, N50 7kb), we resequenced the strain from Spain using PacBio long reads. This produced 4,102,584 filtered subreads of a total of 48,987,175,429 bases. Genome assembly led to a new genome version of 486 scaffolds (N50 3.1Mb). Gene prediction led to identification of 14,104 protein-coding genes of 18,725 bp average length (Table 3). Protein-coding exons represented 5.3% of the genome length. These results are consistent with the known characteristics of *Schistosoma* genomes [39].

Table 3: Assembly and gene prediction metrics of *S.bovis*.

Proportion of genome that is coding (%)	5.27
Number of genes	14,104
Average gene length (bp)	18,725 ± 21,625
Average number of exons per gene	7.9
Average exon length (bp)	299
Average intron length (bp)	2,389
Repeat rate (%)	49.5%

From 10 male and 40 female worms from the natural Corsican hybrid, a total of 93,395,155 and 96,181,625 clusters (2x100 bp paired-end reads) were produced respectively. A total of 289,873,531 reads (76.5%) were mapped against the 681.2 Mb concatenated genomes of *S. haematobium* [39] and *S. bovis* (this work), representing 42X mean coverage. Details on the number of reads and mapping results are presented in Table 4. We also sequenced F1 males from experimental first generation cross between male *S. haematobium* x female *S. bovis* as

a control to validate our analytical pipeline. A total of 2,658,864 clusters (2x150 bp paired-end reads) were produced. Of these, 4,910,354 reads (92.3%) were mapped against the concatenate of *S. haematobium* and *S. bovis* genomes (Table 4).

Table 4: Summary of the introgression level analysis of the experimental F1 hybrids (control) and the Corsican natural hybrid strain.

	Experimental F1 genome (males)	Corsican hybrid genome	
		Males	Females
mapped reads (% of total number)	4,910,354 (92.3%)	150,994,161 (80.8%)	138,879,370 (72.2%)
reads mapped against <i>S. haematobium</i> genome	2,417,196 (49.2%)	116,052,836 (76.9%)	106,969,327 (77%)
reads mapped against <i>S. bovis</i> genome	2,493,158 (50.8%)	34,941,325 (23.1%)	31,910,043 (23%)
reads mapped against <i>S. haematobium</i> mitochondrion	168 (1.7%)	50,436 (2.2%)	33,454 (2.2%)
reads mapped against <i>S. bovis</i> mitochondrion	9,825 (98.3%)	2,229,096 (97.8%)	1,455,815 (97.8%)

As expected, the mapping of the F1 reads to *S. haematobium* and *S. bovis* genomes gave a proportion that perfectly matched the expected genomic proportions of a first generation hybrid (~50% of each of the parental species genome; Table 4). This control was crucial to validate our analytical pipeline and thus the results obtained for the Corsican natural hybrid parasite. Moreover, aligning reads to the COI genes of both species revealed a strong similarity to *S. bovis* gene (98.3%), which is fully consistent with the direction of the F1 cross (female *S. bovis* X male *S. haematobium*) and maternal inheritance of the mitochondrial genome (Table 4).

Interestingly, the mapping of the Corsican hybrid reads against *S. haematobium* and *S. bovis* reference genomes revealed a complex admixture between the parental genomes with a proportion of 76.9% of sequences mapping on *S. haematobium*, and 23.1% mapping on *S. bovis* genomes for both male and female parasites (Table 4). Aligning reads to the COI genes of both parents also showed results concordant with the previous Sanger sequencing data for this marker, with 97.8% of reads being mapped on *S. bovis* mitochondrial genome, and 2.2% on *S. haematobium* mitochondrial genome [32]. To figure out the divergence level between the two pure species genomes, we identified the orthologous regions between *S. haematobium* and *S. bovis* using CACTUS. A total of 234,5 Mb sequences aligned between the parental species, which represents 64% of the *S. haematobium* genome length. The mean similarity of these shared sequences was 95.88 %.

Discussion

The importance and the frequency of hybridization in parasitic species are certainly underestimated, and very little attention has been given so far to the role of introgression in pathogens and the evolution of parasites [25]. The fact that parasites are often hidden inside a host and have morphological characters that are shared with closely related species may explain the lack of evidences on free-living animal species compared to animal parasites. Hybridization has been evidenced in digenean helminths (*Schistosoma*, *Fasciola*, *Paragonimus*, and *Diplostomum*), two cestodes (*Taenia* and *Echinococcus*), one monogenean (*Gyrodactylus*), and five nematodes (*Ascaris*, *Contraecum*, *Parascaris*, *Pseudoterranova*, and *Paramacrostrongylus*, see [25] for review). In the majority of these studies a genetic diagnosis approach was used to detect hybrids using either a parental specific marker, nuclear-mitochondrial discordance, or multi-locus microsatellite markers associated with model-based Bayesian clustering methods.

To our knowledge, our work provides for the first time, a full genome level estimation of the introgression in a helminth parasite. Concerning the genus *Schistosoma*, latest reports have revealed that hybrids are frequent throughout Africa, and are a real concern in terms of parasite transmission, disease control and human and animal health [26–28,40]. Interestingly, it is the first time that a hybrid schistosome is involved in a large-scale outbreak in Europe [32,33,41]. The hybrid status of the parasite might have increased its invasive capacity. In this work we investigated both the genomic composition as well as

several life history traits of the hybrid schistosome that emerged in Europe in 2013. We believe that these results are important not only to understand the evolutionary outcomes but also how it may impact epidemiology through pathogen infectivity, virulence, transmission, or host specificity.

In humans, schistosome eggs that are partly retained in the tissues are the cause for the disease and induced pathology, but are also classical tools for diagnosis and species identification. At first sight, egg morphology and localisation in the urine of infected patients in Corsica strongly suggested an *S. haematobium* infection [32]. Indeed *S. haematobium* eggs that are usually voided by the urine have a typical round to oval shape (elliptical or elongated) with a terminal spine. According to previous studies, *S. haematobium* eggs measure between 100-156 μm long and 40-50 μm wide with usual length between 115-135 μm long [42–47]. A previous analysis of this Corsican hybrid schistosome eggs revealed smaller eggs ($n=15$) with a mean length of 106.5 μm and width of 42.8 μm , and with a spine length of 10.4 μm [33]. According to our results the eggs generally show an ovoid shape measuring 126.4 x 60.8 μm (Table 1) more similar to *S. haematobium* eggs. This is also consistent with the introgression levels that show a predominance of *S. haematobium*-type sequences (Table 4). Sometimes eggs were intermediate with spindle or diamond shapes, which are characteristic of *S. bovis* eggs (usually bigger and measuring between 170-223.9 μm long and 55-66.0 μm wide and have an elongated spindle or diamond shapes [43,47,48] (Fig 1). Consequently, our results confirm earlier publications showing that it is impossible detecting hybridization in African schistosome species using egg morphology alone [34].

We performed for the first time morphological analysis of the adult male and female European hybrid. Surprisingly, very few morphological data except for the length and width is available for the parental species and in particular for *S. haematobium*, thus limiting our potential for comparing with the pure. Moreover, there is no consensus for adult morphology suitable for diagnostic, as the description of the worms may vary due to different sources of biological and technical variation (time of infection, parasite strain and genetics, and host species, but also methods to collect worms and fixation procedure for measurements) [49,50]. We show that the Corsican male and female hybrids are generally smaller (in length and width) when compared to both parental species [50–54], but this may also reflect the difference in the host from which they have been recovered. The most interesting element in this hybrid morphology was the presence of spines on the tubercles of

the males. Indeed, this trait can be useful for taxonomic purpose as it is specific to *S. haematobium* [55–57].

Because the schistosome that emerged in Corsica is a hybrid between *S. haematobium* and *S. bovis*, i.e. two species with different host specificities, it was important to evaluate the compatibility of this hybrid parasite towards the intermediate hosts of both parental species. Indeed, human-infective *S. haematobium*, is specific to *Bulinus* snails as intermediate hosts, while livestock-infective *S. bovis*, has a broader intermediate host range and is able to use both *Bulinus* and *Planorbarius* snails as vector. Interestingly the Corsican hybrid schistosome population that we had recovered was not able to infect our laboratory strain of *Planorbarius metidjensis*, but displayed high levels of compatibility with *Bulinus truncatus* from Corsica (24% of prevalence). This result is consistent with the previous compatibility assessments for the hybrid parasite recovered directly from an infected patient in 2014 [32]. This also goes in line with the predominance of *S. haematobium* type genome in this hybrid. The remaining question is to know if such introgressed schistosomes are still capable of infecting livestock or other reservoir hosts in the field. A recent study suggests that rodents may be the most probable hosts in which hybridization occurs [58]. Indeed, wild rodents in Senegal harboured pure species (*S. bovis*, *S. haematobium*, and *S. mansoni*) as well as hybrids between *S. bovis* and *S. haematobium* [58].

The genome-wide sequencing approach used in this work revealed a complex admixture of the parental genomes, with many hybridization and backcrossing events between pure and hybrid parasites. Our results exclude a simple mitochondrial capture event or a first generation hybrid (for which 50% of sequences from each parental species would be expected). We show here that the genome of the Corsican hybrid presents a predominance of *S. haematobium*-type genome (76.9% of sequences of *S. haematobium* origin) compared to *S. bovis* (23.1% of sequences of *S. bovis* origin). This also suggests that hybridization between these two species is an “old story”, and that the hybrids detected today are the result of ancient crossing events. Nevertheless, it reveals the high permeability of schistosomes to other species’ alleles, with the initial production of a viable offspring that was able to subsequently cross together or backcross with one, or both parental species. Two non-exclusive hypotheses may explain the direction of the cross and the predominance of *S. haematobium*’s alleles in this hybrid. Firstly, it has been shown that *S. haematobium* (particularly males) are better sexual competitors than males of other species. In mating

interaction experiments, it is evident that *S. haematobium* is better in pairing than *S. intercalatum* [59], *S. mattheii* [60] or *S. mansoni* [61]. Even if the competitiveness with *S. bovis* has never been tested, this could explain the direction of the cross, with a *S. bovis* mitochondrial type genome inherited from the mother. Second, we can hypothesize that this could result from host selective pressure as in humans; hybrid populations are more likely to be in contact and backcross with *S. haematobium* pure strains while *S. bovis* is not able to infect humans.

These two species belong to the *haematobium* clade and have been defined based on their host specificity (*S. haematobium* specific to humans as definitive host, and *Bulinus* as intermediate host, while *S. bovis* specific to cattle), but also their living site inside the definitive hosts (in the veins surrounding the bladder for *S. haematobium* or in the mesenteric veins for *S. bovis*). It was traditionally thought that this tropism would prevent heterospecific pairings to occur. One of the remaining questions highlighted with the detection of hybrids and the introgression levels found in this work is to know what the extent and frequency of hybridization events in the field is. Briefly, if hybridization is a rare event and occurred only a few times a long time ago because of host specificity “breakdown”, then the genetics and introgression levels of the hybrid populations in the field should be homogeneous. Conversely, if crossing events are underestimated in the field and prove to be frequent, then distinct hybrid populations should exist with various levels of genomic introgression and different genetic signatures. Thus, it would be necessary to investigate the introgression levels of other hybrids across Africa. This will definitely help to highlight how much these two species of schistosomes are still permeable to gene flow.

Without considering many of the important pre-zygotic barriers that condition the hybridization events, the time of divergence and the genetic divergence between the species is strongly correlated with the viability and possible number of generations that may arise from the crosses. Indeed, incompatibilities between populations are strongly correlated with genetic distance and time of divergence [62], but also the selection operated on the populations that might undergo purifying or diversifying selection. Nevertheless, some studies reported hybridization events between very divergent species, and others suggested that this may be promoted by global changes [63–66]. The maximum divergence between mammalian species to produce viable offspring after independent evolution has been estimated about 2 million years, while successful hybridization of separated species may still

occur after dozens of million years in fish, birds, and turtles [65,66]. The mutation rates, and therefore the genetic divergence between various organisms may differ; therefore it is difficult to predict the hybridization success in other organisms that may not be under the same selective pressures. For example, parasitic species may use different hosts as vector and/or for their reproduction; this may affect the mating systems of these parasites species, and may allow them to hybridize at higher rates than free-living organisms because the reproductive isolation between these distinct parasite populations is expected to be higher. For example, this has been evidenced in two very divergent *Leishmania* species [63].

In schistosomes this may also be the case, with schistosomes species of distinct hosts capable of hybridizing, while others from very divergent geographical areas produce poorly viable offsprings (see, [28] Table 2 for review). The genus *Schistosoma* comprises 23 known species categorized into four major groups based on their distribution, host specificity and egg morphology [67,68]. The *S. japonicum* group and the *S. indicum* groups are found in Asia, whereas both *S. mansoni* and *S. haematobium* groups are found in Africa. The African and the Asian schistosome groups are therefore the most divergent and never overlap in endemic areas, but some examples of interaction and experimental hybridization have been shown to occur between relatively distant schistosomes such as *S. mansoni* and *S. japonicum* [69] and for *S. mansoni* and *S. haematobium* [61,70], but seem poorly successful. The most viable and successful hybrids occur between less divergent species, whatever their differences in host specificity, and are predominantly, but not exclusively found within species of the same clades and especially the *S. haematobium* clade [28] frequently involved in hybridization.

Because no fossil records are available for schistosomes, the origin of the genus and the divergence time estimation between species is not an easy task and remains controversial. Two theories on the origin of these parasites have been discussed with arguments of an African or Asian origin, thus affecting divergence time estimations [67,71–75]. According to the African origin suggested by George Davis [71,72], the African ancestor arrived to Asia during continental drift of Gondwanaland between 70-148 MYA and diverged to form the *S. indicum* and *S. japonicum* groups. This also suggests that the *Schistosoma* ancestors in Africa diverged over 120 MYA, giving rise to the *S. mansoni* and *S. haematobium* groups. According to the theory of an Asian origin of schistosomes [68,76], divergence is more recent with the Asian ancestor schistosome that arrived in Africa around 12-19 MYA

via widespread mammal migration. The remaining schistosomes in Asia formed the *S. japonicum* group, and the African schistosome diverged 1-4 MYA, giving rise to the *S. mansoni* and *S. haematobium* groups (see [73,77] for review). The radiation of schistosomes in the *S. haematobium* and *S. mansoni* groups is another still open question but seems closely associated to human migration and the interaction with other suitable definitive hosts [75]. Whatever theory is true, the divergence time is expected to be less than 4 million years, which is in the range of hybridization success in other species [66]. Furthermore, hybridization within and amongst these clades indicates that speciation may be relatively recent [78].

The karyotype of species is also important regarding the success of hybridization. One of the first causes of hybrid incompatibilities and sterility is attributed to the differences in number of chromosomes, and the incorrect pairing of alleles from two or more genes, especially if they are sex-linked alleles. Introgression of sex chromosomes is generally more limited than that of autosomal regions [79] and this may be detrimental to the heterogametic sex as suggest by Haldane's Rule [80], because it only has a single copy of the deleterious allele. Asian and African schistosomes (including the terminal spined *S. haematobium* group) have the same karyotype with $n=8$ chromosome pairs including sex chromosomes [81]. This would allow chromosome pairing and recombination during the meiosis even with relatively modest levels of similarity between the two species genomes (mean 95.88 % identity over 64% of the genome length for *S. haematobium* and *S. bovis* in our analysis).

Conclusions

This work provides new insight into the study of schistosome hybridization and reveals that their genomes are highly permeable to other species' alleles. Our results suggest that the hybrids between *S. haematobium* and *S. bovis* that emerged in Europe are the result of several backcrosses and not a single crossing event. Similar conclusion has been proposed using microsatellites on *S. rodhaini* x *S. mansoni* hybrids in Kenya [82]. It is now essential to precisely characterize the impact of hybridization and introgression on the life history traits of the parasites and assess the molecular mechanisms underlying these phenotypic changes. Schistosomes with contrasted phenotypes, as it is the case for *S. haematobium* and *S. bovis*, may combine their alleles eventually allowing producing "fittest" or more "adapted" parasites compared to the parental species. These hybrids may have the capacities to take

over the geographical distribution of the parental species, but also rise out of endemic areas, and specifically in the close future with ongoing climate change, up north and towards Europe, making of these hybrid parasites an emerging global threat.

Methods:

Parasite / snail strains and experimental infections

The Corsican hybrid parasite (*S. haematobium* x *S. bovis*) was recovered from eggs found in the urine of a single infected patient and maintained in the laboratory in sympatric *Bulinus truncatus* snails as intermediate hosts and *Mesocricetus auratus* hamsters as definitive hosts [32]. All eggs genotyped using the classic two molecular markers (COI and ITS2) from this patient were diagnosed as hybrids with the ITS2 sequence typical of *S. haematobium* species and the COI sequence typical of *S. bovis* species. Adult worms produced in hamsters were recovered after portal perfusion and male/female couples were manually separated for subsequent analysis. Detailed methods employed for mollusc and rodent infections as well as portal perfusion were described previously [83–85]. *Schistosoma bovis* (Spain) and *Schistosoma haematobium* (Cameroon) were also maintained in the lab using *Planorbarius metidjensis* and *Bulinus truncatus* as intermediate hosts, respectively, and *Mesocricetus auratus* hamsters as definitive hosts [32,86]. Experimental crosses were conducted in the laboratory to produce F1 adult hybrids in hamsters between male *S. haematobium* and female *S. bovis*. For that, we infected intermediate host molluscs with a single miracidium of the parental species in order to obtain male or female clonal populations of *cercariae*. The later were sexed by using molecular markers efficient on both parental species that we had developed previously [86]. We simultaneously exposed hamsters to 300 *cercariae* of male *S. haematobium* and 300 *cercariae* of male *S. bovis*. Three months after infection, hamsters were sacrificed, F1 hybrid eggs collected and used to infect molluscs. The infected molluscs were then used to infest hamsters (pools of 600 *cercariae*) and adult male worms were collected 3 months after exposition. These adult worms were used as a control for the genomic introgression level estimation (expectation of 50% of the genome from each parent).

Hybrid parasite compatibility with snail hosts

Bulinus truncatus as well as *Planorbarius metidjensis* snails that are the natural hosts of *S. haematobium* and *S. bovis* respectively are maintained in the laboratory and were used to infer their susceptibility to the hybrid strain from Corsica. *P. metidjensis* (n=40) and *B. truncatus* (n=40) snails were individually exposed overnight to 5 miracidiae of the parasite in well plate's. Molluscs were individually checked at 35 days after infection for parasite emission of the *cercariae* after light stimulation.

Morphological analysis of the Corsican schistosome hybrid eggs and adult worms

Hamsters infected with the Corsican hybrid schistosomes were euthanized. Twenty adult couples of worms (20 males and 20 females) were collected after hepatic perfusion as well as we recovered encysted eggs from hamster livers. Adult worms and eggs were washed in 8.5% w/v Tris-NaCl solution for subsequent morphological analysis. Male and female worms were manually separated and stored in 70% ethanol. After whole-mounted on glass slides [87] adult worms and eggs were viewed under light microscopy and photographed on a Wild Heerbrugg M400 ZOOM Makroskop (Leica, Germany) or Dialux20 (Leitz, Germany) coupled to Nikon digital sight DS – Fi1 digital camera and all measurements were produced with ImageJ version 1.51 [88,89] and drawings were done by image overlay in Adobe Photoshop CS2 version 9.0.1.

For eggs, objective lens magnification was set to x10 and we measured the length (including the spine), the width (at its larger point), and the size of the terminal spine of the eggs. Concerning adult worms, the following characters were measured in worms of both sexes: worm length and width, area of the oral and ventral suckers, sucker's ratio, sucker ratio per worm length, distance from genital opening to anterior region. In female worms the area of the ovary area and extension of the vitellarium were measured. In males we also recorded the number of testes and the presence or not of tubercles, and characteristic spines on the tubercles.

DNA extraction and sequencing for *Schistosoma bovis* assembly

200 clonal adult male worms were used to prepare high molecular weight genomic DNA using CHEF Genomic DNA Plug Kits (BioRad). The DNA was quantified on a FEMTO Pulse[®], qubit and nanodrop. A total of 8.1 µg genomic DNA was used to generate a size selected

PacBio library. First the DNA was sheared to an average fragment size of 45 kb by gently passing the DNA sample through a 2" long, 26 gauge needle, 4 times and then concentrated using Ampure PB (Pacific Biosciences 100-265-900) before the library was prepared following the standard PacBio size selected library preparation protocol (Procedure & Checklist - 20 kb Template Preparation Using BluePippin™ Size-Selection System). The library was size selected at 15kb, and run on 6 SMRT cells on the Sequel platform, generating 47.9 Gb of data.

RNA extraction and sequencing for *Schistosoma bovis* annotation

Pools of 10-12 adult male and female worms were frozen with liquid nitrogen and grounded using Retsch MM400 cryobrush (2 pulses at 300Hz for 15s). Total RNA was extracted using TRIzol™ Thermo (Fisher Scientific) using manufacturer's protocol followed by DNase treatment with Turbo DNA-free kit. RNA was then purified using the RNeasy mini kit (Qiagen). The TruSeq stranded mRNA library construction kit (Illumina Inc., USA) was used according to the manufacturer's recommendations on 300 ng of total RNA per condition. Library preparation and sequencing was performed at the McGill University in the Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada on a Illumina HiSeq 4000 (100 bp paired-end reads).

***Schistosoma bovis* genome assembly and annotation**

A total of 48 Gb PacBio reads were assembled using HGAP4 to generate a 446 Mb assembly in 486 contigs, with an N50 of 3.1 Mb in 38 contigs.

Gene prediction was carried out with AUGUSTUS 3.3.1. No new training was performed for our data but the parameter set "schistosoma2" of the AUGUSTUS distribution was used. RepeatMasker 4.0.7 and RepeatScout 1.0.5 were used for repeat masking. RNAseq data from male and female adult worms was employed as external hints. This RNA-seq data was aligned with STAR version 020201. The results of the gene prediction are available as track data hub of the UCSC genome browser under the following URL: http://ihpe.univ-perp.fr/IHPE_tracks/S.bovis/hub.txt.

DNA extraction and sequencing for the Corsican hybrid strain and experimental *S. haematobium* x *S. bovis* F1

Genomic DNA of the Corsican schistosome hybrids was recovered from one pool of 10 adult males and one pool of 40 adult females separately, while DNA of the experimental F1 progeny was recovered from a pool of 10 adult males. DNA was extracted using Qiamp DNA microkit tissue kit from Qiagen following manufacturer's protocol. After the lysis step, we used 4 μ l (100 mg/ml) of RNase A (Qiagen) for 2 min at room temperature to digest RNA. The final elution step was performed twice with 35 μ l of Tris HCl 5 mM pH 8.5. DNA quantification was performed using a Qubit fluorometer with the dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen), and concentrations were estimated at 12.7 ng/ μ l for males and 12.8 ng/ μ l for females (Corsican parasites) and 4.24 ng/ μ l for the experimental F1 males. Genomic DNA of the Corsican hybrid worms was then sent to Genome Quebec for library construction using the Illumina TruSeq kit starting from 200 ng of genomic DNA (for each sex), and sequencing was performed on a Illumina HiSeq 2000 (100 bp paired-end reads). For the experimental F1 hybrid males, library construction was performed using the Nextera XT kit starting from 1 ng and sequenced on a Illumina NextSeq 550 (150 bp paired-end reads) on the Bio-Environment NGS platform at University of Perpignan.

Estimation of the genomic introgression levels for the hybrid strain

The sequencing reads were checked for quality and had PHRED score was > 30 over 90% of read length with no adapter contamination. All reads were retained for further analysis and aligned to a chimeric concatenate of *S. haematobium* and *S. bovis* genomes using the short alignment tool Bowtie 2 [90]. We used the SchistoDB *S. haematobium* genome [39] and the *S. bovis* SBOS_v1.1 assembly genome produced for this study and available at ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Schistosoma/bovis/SBOS_v1.1_pilon.fasta. To avoid mapping bias due to differences in assembly size between the two genomes, only scaffolds > 1Mb were retained for further analysis. The genome size after concatenation of *S. haematobium* and *S. bovis* was 681.2 Mb. Mapping was thus performed by allowing each read, depending on its origin, to map against the more similar location in one or the other species genome. Simple descriptive statistics were then performed on the BAM mapping files using SAMtools [91]. After aligning high quality sequencing reads to the concatenate of

both *S. haematobium* and *S. bovis* genomes we counted the proportion of best location of aligned reads (*S. bovis* or *S. haematobium* genomes) in the SAM files.

We were also willing to explore the introgression levels of the mitochondrial genome of these hybrid schistosomes. The scaffold 000439F contained the mitochondrial genome of *S. bovis*, and we also downloaded the *S. haematobium* mitochondrion genome from GenBank accession NC_008074 [92]. The two genomes were concatenated and used as reference to map the Corsican genome reads, again by restricting to best mapping location reads, and counting the proportion of reads aligned to each of the two organelle genomes.

Similarity analysis between *S. haematobium* and *S. bovis* genomes

The two species genomes were aligned with CACTUS [93] using the pre-release version msca_1508_Progressive_Cactus (<https://github.com/glennhickey/progressiveCactus/releases>). We then processed the CACTUS output, identifying all alignments blocks composed of exactly one genome part of *S. bovis* and exactly one genome part of *S. haematobium*.

Declarations

Ethics approval

Housing, feeding and animal care, including experiments on animals were carried out according to the national ethical standards established in the writ of 1 February 2013 (NOR: AGRG1238753A) setting the conditions for approval, planning and operation of establishments, breeders and suppliers of animals used for scientific purposes and controls. The Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations (DDSCPP) provided the permit N°C66 – 136 -01 to our laboratory for experiments on animals. The investigator possesses the official certificate for animal experimentation (Decree n° 87–848 du 19 octobre 1987; number of the authorization 007083).

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and material

The Illumina datasets for the Corsican hybrid strain are available in the SRA repository under submission number SUB4330327 (to be released upon publication). The *S. bovis* PacBio data are available under accession number ERS2549235. The *Schistosoma bovis* assembly SBOS_v1.1 is available at

ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Schistosoma/bovis/SBOS_v1.1_pilon.fasta.

Annotations are available as trackhub at http://ihpe.univ-perp.fr/IHPE_tracks/S.bovis/hub.txt.

Competing interests

The authors have no competing interests to declare.

Funding

Research reported in this publication was supported by Wellcome Trust Strategic Award ‘Flatworm Functional Genomics Initiative (FUGI)’, grant number 107475/Z/15/Z; Deutsche Forschungsgemeinschaft Fellowship BU 2685/5-1; Health Research Project No. PI16/00520, Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación, ISCIII-MINECO, Madrid, Spain; Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales – RICET (Project No. RD16/0027/0023 of the PN de I+D+I, ISCIII-RETICS), Ministry of Health and Consumption, Madrid, Spain; Wellcome Trust grant WT 098051; the French National Research Agency ANR project HYSWARM.

Authors' contributions

ET and JB conceived and designed the study. JB, AO and SMC procured the parasite and snail strains. JKS, AR, and JB performed the experiments. RA conducted the morphological analysis. NH and JFA prepared the DNA for sequencing. NH coordinated the long read DNA sequencing experiments. JKS, AT, IB, MB and ET conducted the computational data processing and analysis with significant assistance and input from OR, CC and CG. JKS and ET wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the NGS facility at the bio-environment platform (University of Perpignan) and DNA Pipelines at Wellcome Sanger Institute, in particular Michelle Smith and Craig Corton.

Additional files



Additional Figure S1: Morphology of natural hybrid from Corsican strain. Sexual dimorphism of the hybrid schistosomes with adult females living in the gynaecophoric canal of adult male parasites.

References

1. Mclintock, B. The Significance of Responses of the Genome to Challenge. *Science*, 1984, vol. 226, no 4676, p. 792-801.
2. Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, et al. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in Arabidopsis interspecific hybrids and allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 20;106(42):17835-40.
3. Ito H, Langenhorst T, Ogden R, Inoue-Murayama M. Population genetic diversity and hybrid detection in captive zebras. *Sci Rep*, 2015;5:1–8. <http://dx.doi.org/10.1038/srep13171>
4. Mallet J. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 2005. vol 20 p. 229–37.
5. Bar-Zvi D, Lupo O, Levy AA, Barkai N. Hybrid vigor: The best of both parents, or a genomic clash? *Curr Opin Syst Biol* 2017;6:22–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coisb.2017.08.004>
6. Baranwal VK, Mikkilineni V, Zehr UB, Tyagi AK, Kapoor S. Heterosis: emerging ideas about hybrid vigour. *J Exp Bot*. 2012 Nov;63(18):6309–14.
7. Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S. Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(35):12957–8.
8. Rhymer JM, Simberloff D. Extinction by Hybridization and Introgression. *Annu Rev Ecol Syst*. Annual Reviews; 1996;27:83–109.
9. Seehausen O. Hybridization and adaptive radiation. Vol. 19, *Trends in Ecology and Evolution*. 2004. p. 198–207.
10. Barton NH. The role of hybridization in evolution. *Mol Ecol*. 2001;10(3):551–68.
11. Tsai H, Liu J, Stabent C, Michael J, Siegel MR, Schardl CL, et al. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloa* species. 1994;91:2542–6.
12. Mavárez J, Salazar CA, Bermingham E, Salcedo C, Jiggins CD, Linares M. Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. *Nature*. 2006;441(7095):868.
13. Wu X, Lu Y, Zhou S, Chen L, Xu B. Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. *Environ Int*. 2016;86:14–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.007>

14. Kim K-H, Kabir E, Ara Jahan S. A review of the consequences of global climate change on human health. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2014;32(3):299–318.
15. Cockayne L, Allan HH. The naming of wild hybrid swarms. *Nature.* 1926. p. 623–4. <http://dx.doi.org/10.1038/118623a0>
16. Mayr E. *Animal Species and Evolution.*,(Belknap Press of Harvard University: Cambridge, IL.). 1963.
17. Arnold ML. *Natural hybridization and evolution.* Oxford University Press on Demand; 1997.
18. Arnold ML. Natural hybridization and the evolution of domesticated, pest and disease organisms. Vol. 13, *Molecular Ecology.* 2004. p. 997–1007.
19. Dowling TE, DeMaris BD. Evolutionary significance of introgressive hybridization in cyprinid fishes. *Nature.* 1993;362(6419):444–6.
20. Johnston JA, Arnold ML, Donovan LA. High hybrid fitness at seed and seedling life history stages in Louisiana irises. *J Ecol.* 2012;91(3):438–46. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00774.x>
21. Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(13).
22. Grant PR, Grant BR. Hybridization of bird species. *Science (80-). American Association for the Advancement of Science;* 1992;256(5054):193–7.
23. Grant PR, Grant BR. Hybridization , Sexual Imprinting , and Mate Choice. *Am Nat.* 1997;149(1):1–28.
24. Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, et al. Major ecological transitions in wild sunflower facilitated by hybridization. *Science.* 2003;301(August):1211–6.
25. Detwiler JT, Criscione CD. An infectious topic in reticulate evolution: Introgression and hybridization in animal parasites. Vol. 1, *Genes.* 2010. p. 102–23.
26. King KC, Stelkens RB, Webster JP, Smith DF, Brockhurst MA. Hybridization in Parasites: Consequences for Adaptive Evolution, Pathogenesis, and Public Health in a Changing World. *PLoS Pathog.* 2015;11(9):1–12.
27. Brasier CM, Cooke DEL, Duncan JM. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(10):5878–83.

28. Leger E, Webster JP. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology*. 2016;1–16.
29. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*. 2000;77(1):41–51.
30. De Bont J, Vercruyse J. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. Vol. 13, *Parasitology Today*. 1997. p. 255–62.
31. Ramalli L, Mulero S, Noël H, Chiappini JD, Vincent J, Barré-Cardi H, et al. Persistence of schistosomal transmission linked to the cavu river in southern Corsica since 2013. *Eurosurveillance*. 2018;23(4):2–5.
32. Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, Allienne J-F, Huyse T, Mas-Coma S, et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;3099(16):1–9.
33. Moné H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsá-Nguéma R, Ibikounlé M, Boissier J, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol Res*. 2015;114(11):4127–33.
34. Boon NAM, Fannes W, Rombouts S, Polman K, Volckaert FAM, Huyse T. Detecting hybridization in African schistosome species: does egg morphology complement molecular species identification? *Parasitology*. 2017;144(7):954-964.
35. Bryson RW, Smith BT, Nieto-Montes de Oca A, García-Vázquez UO, Riddle BR. The role of mitochondrial introgression in illuminating the evolutionary history of Nearctic treefrogs. *Zool J Linn Soc*. 2014;172(1):103–16.
36. Linnen CR, Farrell BD. Mitonuclear discordance is caused by rampant mitochondrial introgression in *Neodiprion* (Hymenoptera: Diprionidae) sawflies. *Evolution*. 2007;1417–38.
37. Perea S, Vuki J, Radek S. Ancient Mitochondrial Capture as Factor Promoting Mitonuclear Discordance in Freshwater Fishes : A Case Study in the Genus *Squalius* (Actinopterygii , Cyprinidae) in Greece. *PLoS One*. 2016; 1;11(12):e0166292.
38. Marková S, Dufresne F, Manca M, Kotlík P. Mitochondrial Capture Misleads about Ecological Speciation in the *Daphnia pulex* Complex. *PLoS One*. 2013;8(7):1–14.
39. Young ND, Jex AR, Li B, Liu S, Yang L, Xiong Z, et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat Genet*. 2012;44(2):221–5.
40. Castro-Nallar E, Pérez-Losada M, Burton GF, Crandall KA. The evolution of HIV: Inferences using phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol*. 2012 Feb 27;62(2):777–92.

41. Holtfreter MC, Moné H, Müller-Stöver I, Mouahid G, Richter J. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Eurosurveillance*. 2014;19(22).
42. Capron A, Deblock S, Biguet J, Clay A, Adenis L, Vernes A, et al. Contribution a l' étude expérimentale de la bilharziose à *Schistosoma haematobium*. *Bull. Org. Mond. Santé*. 1965;755–78.
43. Pitchford RJ. Differences in the Egg Morphology and Certain Biological Characteristics of Some African and Middle Eastern Schistosomes , Genus *Schistosoma* , with Terminal-Spined Eggs. *Bull World Health Organ*. 1965;105–20.
44. Moné H, Minguez S, Ibikounlé M, Allienne JF, Massougbody A, Mouahid G. Natural interactions between *S. haematobium* and *S. guineensis* in the Republic of Benin. *Sci World J*. 2012;2012.
45. Loker ES. A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology*. 1983;87(2):343–69.
46. Richard-Lenoble D, Kombila M, Duong TH, Gendrel D. Bilharziasis caused by *Schistosoma intercalatum*, a recent and forgotten form of schistosomiasis. *Rev Prat*. 1993;43(4):432–9.
47. Alves W. The Eggs of *Schistosoma bovis*, *S. mattheei* and *S. haematobium*. *J Helminthol*. 1949;23(3–4):127–34.
48. Rollinson D, Southgate VR, Vercruyse J, Moore PJ. Observations on natural and experimental interactions between *Schistosoma bovis* and *S. curassoni* from West Africa. *Acta Trop*. 1990;47(2):101–14.
49. Wright CA, Knowles RJ. Studies on *Schistosoma haematobium* in the laboratory III. Strains from Iran, Mauritius and Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1972;66(1):108–18.
50. Basch PF. *Schistosomes: development, reproduction, and host relations*. Oxford University Press; 1991.
51. Sahba GH, Malek EA. Unisexual infections with *Schistosoma haematobium* in the white mouse. *Am J Trop Med Hyg*. 1977;26(2):331–3.
52. Brumpt E. Cycle évolutif complet de *Schistosoma bovis*-Infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bullinus contortus*. *Ann Parasitol Hum Comp*. EDP Sciences; 1930;8(1):17–50.
53. James C, Webbe G. A comparison of Sudanese and South African strains of *Schistosoma haematobium*. *J Helminthol*. 1975;49(3):191–7.

54. Leroux PL. Abnormal adaptations and development of schistosomes in experimental animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1949;43(1):2–3.
55. Southgate VR, Rollinson D, Vercruysse J. Scanning electron microscopy of the tegument of adult *Schistosoma curassoni*, and comparison with male *S. bovis* and *S. haematobium* from Senegal. *Parasitology.* 1986;93(3):433–42.
56. Leitch B, Probert AJ, Runham NW. The ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma haematobium*. 1984;71–8.
57. Fournier A, Pages JR, Touassem R, Mouahid A. Can tegumental morphology be used as a taxonomic criterion between *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, and *S. bovis*. *Parasitol Res.* 1989;75(5):375–80.
58. Catalano S, Sène M, Diouf ND, Fall CB, Borlase A, Léger E, et al. Rodents as Natural Hosts of Zoonotic *Schistosoma* Species and Hybrids: An Epidemiological and Evolutionary Perspective From West Africa. *J Infect Dis.* 2018; jiy029. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiy029>
59. Southgate V., Tchuem Tchuente LA, Vercruysse J, Jourdane J. Mating behaviour in mixed infections of *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei*. *Parasitol Res.* 1995;81(8):651–6.
60. Webster BL, Southgate VR. Mating interactions of *Schistosoma haematobium* and *S. intercalatum* with their hybrid offspring. *Parasitology.* 2003;126(4):327–38.
61. Webster BL, Southgate VR, Tchuem Tchuente L-A. Mating interactions between *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni*. *J Helminthol.* 1999;73(4):351–6.
62. Coyne JA, Orr A. “Patterns of speciation in drosophila” revisited. *Evolution.* 1997;51(1):295–303.
63. Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet J-P, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol.* 2006;36(13):1383–8.
64. Akiyama K, Noguchi J, Hirose M, Kajita S, Katayama K, Khalaj M, et al. A Mutation in the nuclear pore complex gene *tmem48* causes gametogenesis defects in skeletal fusions with sterility (*sks*) mice. *J Biol Chem.* 2013;288(44):31830–41.
65. Jancuchova J, Landova E, Frynta D. Are genetically distinct lizard species able to hybridize? A review. Vol. 61, *Current Zoology.* 2015. p. 155–80.
66. Edmands S. Does parental divergence predict reproductive compatibility? *Trends Ecol Evol.* 2002;17(11):520–7.

67. Agatsuma T. Origin and evolution of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int.* 2003;52(4):335–40.
68. Rollinson D, Kaukas A, Johnston DA, Simpson AJG, Tanaka M. Some molecular insights into schistosome evolution. Vol. 27, *International Journal for Parasitology*. 1997. p. 11–28.
69. Fan PC, Lin LH. Hybridization of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in mice. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005;36(1):89–96.
70. Cunin P, Tchuem Tchuente LA, Poste B, Djibrilla K, Martin PM. Interactions between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* in humans in north Cameroon. *Trop Med Int Heal.* 2003 Nov 27;8(12):1110–7. <https://doi.org/10.1046/j.1360-2276.2003.01139.x>
71. Davis GM. Evolution of prosobranch snails transmitting Asian *Schistosoma*; coevolution with *Schistosoma*: a review. In: *Progress in Clinical Parasitology*. 1993. p. 145–204.
72. Davis GM. Snail hosts of Asian *Schistosoma* infecting man: Evolution and coevolution. *Snail hosts Asian Schistosoma Infect man Evol coevolution. Malacological Review.* 1980;195–238.
73. Morgan JA, Dejong RJ, Snyder SD, Mkoji GM, Loker ES. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology.* 2001;123 Suppl:S211–28.
74. Agatsuma T., Iwagami M, Liu CX, Rajapakse RPVJ, Mondal MMH, Kitikoon V, et al. Affinities between Asian non-human *Schistosoma* species, the *S. indicum* group, and the African human schistosomes. *J Helminthol.* 2002;76(1):7–19.
75. Webster BL, Southgate VR, Timothy D, Littlewood J. A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. *Int J Parasitol.* 2006;36(8):947–55.
76. Snyder SD, Loker ES. Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (Platyhelminthes:Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma*. *J Parasitol.* 2000;86(2):283–8.
77. Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA, Rollinson D. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasit Vectors.* 2011;4(1):131.
78. Southgate VR, Jourdan J, Tchuem Tchuente LA. Recent studies on the reproductive biology of the schistosomes and their relevance to speciation in the Digenea. Vol. 28, *International Journal for Parasitology*. 1998. p. 1159–72.

79. Martin SH, Dasmahapatra KK, Nadeau NJ, Salazar C, Walters JR, Simpson F, et al. Genome-wide evidence for speciation with gene flow in *Heliconius* butterflies. *Genome Res.* 2013 Nov;23(11):1817-28.
80. Schilthuizen M, Giesbers M, Beukeboom LW. Haldane ' s rule in the 21st century. *Heredity.* 2011;95–102.
81. Grossman a I, Short RB, Cain GD. Karyotype evolution and sex chromosome differentiation in Schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae). *Chromosoma.* 1981;84(3):413–30.
82. Steinauer ML, Hanelt B, Mwangi IN, Maina GM, Agola LE, Kinuthia JM, et al. Introgressive hybridization of human and rodent schistosome parasites in western Kenya. *Mol Ecol.* 2008;17(23):5062–74.
83. Boissier J, Rivera ER, Moné H. Altered behavior of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 2003;89(3):429–33.
84. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2003;91(2):144–50.
85. Théron a, Pages JR, Rognon a. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Exp Parasitol.* 1997;85:1–9.
86. Kincaid-Smith J, Boissier J, Allienne J-F, Oleaga A, Djuikwo-Teukeng F, Toulza E. A Genome Wide Comparison to Identify Markers to Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Nov 18;10(11):e0005138. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005138>
87. Hulstijn M, Barros LA, Neves RH, Moura EG, Machado-Silva JR. Morphological changes in the reproductive organs of male and female *Schistosoma mansoni* worms caused by streptozotocin, a drug used to induce diabetes mellitus. *Parasitology.* 2003;126(1):53–61.
88. Abràmoff MD, Hospitals I, Magalhães PJ, Abràmoff M. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics international.* 2004; volume 11, issue 7, pp. 36 - 42.
89. Prodanov D, Verstreken K. Automated Segmentation and Morphometry of Cell and Tissue Structures. Selected Algorithms in ImageJ. *Molecular Imaging Bernhard Schaller, IntechOpen, 2002. DOI: 10.5772/36729.*
90. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg S. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10(3):R25.

91. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078–9.
92. Littlewood DTJ, Lockyer AE, Webster BL, Johnston DA, Le TH. The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. *Mol Phylogenet Evol*. 2006;39(2):452–67.
93. Paten B, Earl D, Nguyen N, Diekhans M, Zerbino D, Haussler D. Cactus: Algorithms for genome multiple sequence alignment. *Genome Res*. 2011 Sep;21(9):1512–28.

Chapitre 2 : Développement de marqueurs du sexe et analyse des choix sexuels des espèces parentales *S. haematobium* et *S. bovis*

1) À la recherche de marqueurs du sexe

- **Publication** : Kincaid-smith J, Oleaga A, Kincaid-smith J. A Genome Wide Comparison to Identify Markers to Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids. PLOS Neglected Tropical Diseases 10(11): e0005138. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005138>.

Chez les parasites gonochoriques du genre *Schistosoma*, les adultes présentent un fort dimorphisme sexuel déterminé par un système chromosomique hétérogamétique femelle de type ZW (ZZ chez les mâles). Le sexe des individus adultes présents chez l'hôte définitif peut donc être facilement déterminé sur des critères morphologiques. En revanche, le sexe des stades larvaires du parasite, issus des œufs (*miracidia*) ou des mollusques (cercaires), est morphologiquement indifférenciable, bien que génétiquement distinct. Afin d'étudier séparément les mâles et les femelles et de contrôler les infestations expérimentales de hamsters, sièges de la reproduction et donc de l'hybridation pour les croisements expérimentaux, des marqueurs moléculaires étaient indispensables. Bien que de tels marqueurs basés sur les régions W-spécifiques des femelles aient déjà été développés chez une autre espèce, *S. mansoni* (Boissier et al. 2001; Chevalier et al. 2016; Gasser et al. 1991; Portela et al. 2010), ils ne sont pas efficaces pour le groupe *haematobium*, probablement en raison d'une forte divergence sur ces régions non codantes. Nous avons développé et mis au point une méthode PCR basée sur des séquences femelles spécifiques afin de déterminer le sexe des individus à chaque étape du cycle de vie du parasite. Ce travail s'est appuyé sur le séquençage génomique de mâles et de femelles adultes de l'hybride Corse, et sur une analyse comparative du génome des deux sexes. Les marqueurs moléculaires identifiés sont efficaces chez *S. haematobium*, *S. bovis* ainsi que chez l'hybride naturel. Cette mise au point technique était indispensable afin de mettre en place l'ensemble des études d'évolution expérimentale menées au cours de cette thèse.

RESEARCH ARTICLE

A Genome Wide Comparison to Identify Markers to Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids

Julien Kincaid-Smith¹, Jérôme Boissier¹, Jean-François Allienne¹, Ana Oleaga², Félicité Djuikwo-Teukeng³, Eve Toulza^{1*}

1 Université de Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Université de Montpellier, France, **2** Parasitology Laboratory, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, Spain, **3** Université des Montagnes Faculty of Health Sciences, Bangangté, Cameroon

* eve.toulza@univ-perp.fr



OPEN ACCESS

Citation: Kincaid-Smith J, Boissier J, Allienne J-F, Oleaga A, Djuikwo-Teukeng F, Toulza E (2016) A Genome Wide Comparison to Identify Markers to Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids. PLoS Negl Trop Dis 10(11): e0005138. doi:10.1371/journal.pntd.0005138

Editor: Robin B. Gasser, University of Melbourne, AUSTRALIA

Received: June 16, 2016

Accepted: October 25, 2016

Published: November 18, 2016

Copyright: © 2016 Kincaid-Smith et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

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

Abstract

For scientists working on gonochoric organisms, determining sex can be crucial for many biological questions and experimental studies, such as crossbreeding, but it can also be a challenging task, particularly when no sexual dimorphism is visible or cannot be directly observed. In metazoan parasites of the genus *Schistosoma* responsible for schistosomiasis, sex is genetically determined in the zygote with a female heterogametic ZW/ZZ system. Adult flukes have a pronounced sexual dimorphism, whereas the sexes of the larval stages are morphologically indistinguishable but can be distinguished uniquely by using molecular methods. Therefore, reliable methods are needed to identify the sex of larvae individuals. Here, we present an endpoint PCR-based assay using female-specific sequences identified using a genome-wide comparative analysis between males and females. This work allowed us to identify sex-markers for *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* but also the hybrid between both species that has recently emerged in Corsica (France). Five molecular sex-markers were identified and are female-specific in *S. haematobium* and the hybrid parasite, whereas three of them are also female-specific in *S. bovis*. These molecular markers will be useful to conduct studies, such as experimental crosses on these disease-causing blood flukes, which are still largely neglected but no longer restricted to tropical areas.

Author Summary

Current global changes (environmental and anthropogenic) are expected to promote the spread and transmission of infectious diseases. One of the direct consequences of such changes is the modification of the geographical distribution of species, enabling natural hybridization. Such hybridization is already known to occur in schistosomes, and

offspring have been shown to have superior virulence and invasive capacities. The recent outbreak of a hybrid between the human- and animal- infecting schistosomes, *S. haematobium* x *S. bovis*, in Europe (Corsica, France) clearly demonstrates this invasive capacity and raises the risk of zoonotic transmission. Therefore, it is important to study such hybrids, and experimental crosses are critical to address this issue. Here, we developed molecular sex markers for *S. haematobium* and *S. bovis* in order to distinguish gender and to be able to generate differentially introgressed hybrids, allowing us to investigate parasite fitness.

Introduction

Flatworm parasites of the genus *Schistosoma* are well known trematodes for their serious threat to human and animal health. These blood flukes cause schistosomiasis, a neglected disease which ranks second to malaria, in terms of morbidity and mortality [1]. More than 200 million people are infected worldwide, and the parasite is endemic to 78 countries in tropical and subtropical areas [2,3]. Schistosomes are endoparasites with a complex lifecycle involving two obligatory hosts. One is a freshwater mollusc, as an intermediate host, and humans or mammals represent definitive hosts. In the definitive host, monogamous couples of worms sexually reproduce, and females release hundreds of eggs daily. The elimination of eggs through host faeces or urine in a freshwater environment allows the development of free-swimming larvae called miracidia. These larvae actively search for their intermediate mollusc hosts, which they penetrate and develop via asexual multiplication to produce thousands of vertebrate infecting larvae (cercariae). A unique feature of the *Schistosoma* genus amongst other hermaphroditic trematodes is their gonochorism. Sexes are genetically determined during egg fertilization by a ZZ/ZW chromosomal system, where the female is the heterogametic sex [4]. Sexual dimorphism strongly characterises schistosome adult worms (*i.e.* a muscular adult male *vs.* a thin adult female). Furthermore, females do not fully mature in the absence of males. By contrast, male and female larval stages are morphologically indistinguishable [5,6].

Recently, an outbreak of urogenital schistosomiasis occurred in Corsica [7,8]. This French Mediterranean Island is particularly attractive for tourists, and its population increases from 300,000 to 3 million people in summer season. With more than 100 people infected in Corsica, this outbreak demonstrates how easily a tropical disease, possibly under the influence of global changes (*i.e.* climate change and human migration), could emerge in temperate continental areas [9]. Urogenital schistosomiasis is usually caused by *S. haematobium*. This species is widely present in Africa and in the Arabic Peninsula, and is the only schistosome species in the vessels of the urogenital tract (mainly bladder) of humans. Surprisingly, molecular investigations (sequencing of the mitochondrial *cox1* gene and nuclear ribosomal internal transcribed spacer DNA = ITS) have revealed that the parasite incriminated in the Corsican outbreak was not a pure *S. haematobium* parasite, but a hybrid between *S. haematobium* and *S. bovis* [10,11]. *S. bovis* is a parasite of the same monophyletic group referred to as the *S. haematobium* group [12]. However it is not a human, but rather a livestock parasite, infecting cows, sheep or goats, and lives in the mesentery instead of the bladder vessels. This hybrid parasite makes the epidemiological situation complex and raises the risk of zoonotic transmission. One relevant question is the importance of the hybrid vigour of a parasite in such situation. Parasite hybridization has been shown to impact parasite infectivity, virulence, transmission and/or host specificity in fungal, viral, bacterial and parasitic helminths (see [13] for recent synthesis). Such hybrid vigour has already been demonstrated in the laboratory, with *S. haematobium* x *S.*

intercalatum (a parasite of human belonging to the same *S. haematobium* group) crosses. These last hybrids have a better capacity to invade and develop into their respective molluscan or experimental rodent hosts compared with both parental species [14]. Hybrid vigour of the parasite is therefore an important aspect to study, and experimental crosses are critical to explore the hybridisation process. Such experimental crosses necessitate controlling the sex of cercariae proposed to experimental rodent host infection. Because larvae sex cannot be distinguished morphologically, molecular markers based on W-specific regions are crucial to identify the larval form. Such sex markers have already been developed in *S. mansoni* [15–18]. It has been shown previously that massive sequencing methods allow rapid comparisons of genomes and identification of sex-specific sequences in *S. mansoni* [18]. Therefore, we developed a robust and reliable endpoint PCR method to distinguish the sexes of *S. bovis* and *S. haematobium* at any developmental stage. The markers can also be applied efficiently to the hybrid strain recovered from Corsica.

Materials and Methods

Parasitological methods

Schistosome species, hosts and origin of the parasite strains used in this study are summarized in Table 1. For each strain, molluscs were individually exposed to a single miracidium of unknown sex. Twenty-eight (for *S. bovis*) to 45 days (for *S. haematobium* or the Corsican hybrid strain) after miracidium exposure, molluscs released either male or female clonal populations of cercariae. Cercariae from single molluscs were used to individually infect hamster definitive hosts. Three months after exposing hamsters to cercariae, adult worms were recovered by portal perfusion as described previously [19]. Only at this step, are male and female morphologically distinct. Individual male and female worms were stored for subsequent molecular analyses. Male and female of the hybrid strain were used for whole genome sequencing and the subsequent identification of sex markers (see below). Thereafter, these markers were tested on male and female of the three strains (Table 1). Detailed methods employed for molluscan and rodent infections were described previously [20,21].

Identification of sex markers

Genome sequencing. Genomic DNA was separately sequenced from males and females (one pool of 10 males and one pool of 40 females) of *S. haematobium* x *S. bovis* hybrid adult worms (produced in rodents after recovering eggs from urine of an infected human patient) using Illumina HiSeq 2000 PE100 technology. DNA was extracted using Qiamp DNA microkit tissue protocol from Qiagen. After the lysis step, we used 4 µl (100 mg/ml) of RNase A (Qiagen) for 2 min at room temperature to digest RNA. The final elution step was performed twice with 35 µl of Tris HCl 5 mM pH 8.5. DNA quantification was performed using a QubitTM dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen), and concentrations were estimated at 12.7 ng/µl for males and 12.8 ng/µl for females. DNA was then sent to Genome Quebec for library construction from 700 ng of genomic DNA (for each sex). A total of 192,363,250 and 186,790,310 reads were produced from males and females, respectively.

Table 1. Schistosome species, hosts and origins of the parasite strains.

Schistosome species	Intermediate host	Definitive host	Origin	Year of isolation	References
<i>S. haematobium</i> x <i>S. bovis</i>	<i>Bulinus truncatus</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>	Cavu River, Corsica, (France)	2014	[10,11]
<i>S. haematobium</i>	<i>Bulinus truncatus</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>	Barombi Kotto Lake, (Cameroon)	2015	This study
<i>S. bovis</i>	<i>Planorbium metidjensis</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>	Villar de la Yegua-Salamanca, (Spain)	1970	[22]

doi:10.1371/journal.pntd.0005138.t001

In silico analysis. The sequencing reads were filtered for quality (PHRED score < 30 for 90% of read length; Q30/90%). Then, we removed primers and adapters with the algorithm cutadapt [23]. Finally, ~144 million (75%) reads of high quality for males and females remained for subsequent analysis.

To discriminate sex-specific sequences from unbalanced genomic introgression, high quality sequencing reads were aligned to either *S. haematobium*, *S. bovis* or to a chimeric concatenate of both genomes (allowing each read, depending on its origin, to map against the more similar location in one or the other species' genome). We used the SchistoDB *S. haematobium* genome [24] and the *S. bovis* draft assembly genome available at the Sanger institute website. The short alignment tool Bowtie2 [25] was used; mapping was performed in single-end with pre-set parameters (`—sensitive -D 15 -R 2 -L 22 -i S, 1,1.15`) and by restricting to uniquely mapped reads. Because the assembly of the *S. bovis* genome (362 Mb) is highly fragmented (>100,000 scaffolds; N50 = 7.0 kb), most effort concentrated on mapping reads to the genome of *S. haematobium* (385 Mb genome; 3 833 scaffolds; N50 = 307 kb).

Two independent and complementary methods were used to detect female specific sequences, with 1) a visual inspection of reads aligned to the genomes of parental species (example in S1 Fig), and 2) a copy number variation detection using CNV-seq between male and female reads [26]. The visual inspection of genomic read alignments was performed using the Integrative Genomics Viewer (IGV) [27] to find regions showing exclusive coverage in females. Scaffolds and contigs were randomly inspected in the genomes of *S. bovis* and *S. haematobium* for potential female specific sequences. The CNV-seq method was used to compare coverage between males and females along the genome. The minimum window size was set to 500 bp, log2 ratio to 0.6 and p-value stringency to 10⁻⁶. *S. bovis* and *S. haematobium* reference genomes were used, alternatively, and regions showing specific coverage for females were selected.

Consensus candidate sequences were extracted using IGV, and primers were designed using the program Primer3Plus [28]. In order to confirm specificity, primers were compared (by BLAST) against the genome that they were originally identified in.

Validation of sex markers

DNAs of single adult worms of each sex were extracted, as recommended from the QIAGEN QIAamp DNA Micro Kit protocol for isolation of genomic DNA from tissues. The final elution was in 40 µl of buffer AE (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0). Sex markers were also tested on cercariae of *S. haematobium*. DNA extraction from cercariae was conducted as published by our colleagues [29].

We used a multiplex approach with the *GAPDH* gene as an internal PCR control (Table 2). The reactions were carried out in a total volume of 12.5 µl containing GoTaq Flexi Reaction Buffer (Promega), 1.5 mM of MgCl₂, 0.4 µM of each primers of both markers (at 10 µM each), 0.2 µM of dNTP solution (at 10 µM each), 0.5 U of GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega, USA) and 10 ng of DNA template (except no-DNA controls). The PCR protocol was: an initial denaturation phase at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 30s, 57°C for 30s, 72°C for 40s, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were examined on 1.5% agarose gels using a 100 bp-DNA Ladder (Promega) for size estimation. PCR amplifications were performed using biological duplicates of adult male and female worms of *S. haematobium*, *S. bovis* and the hybrid, and using seven replicates of a pool of 5 cercariae recovered from molluscs infected by only one miracidium (*i.e.* one sex). The sex of the clonal populations of cercariae was confirmed by infecting hamsters, and morphological examination of adults that developed. In total, 35 individuals were used to validate sex markers (Fig 1 and S2 Fig).

Table 2. Summary information of the sex-specific markers identified.

Name	Primer sequences (5'-3')	Scaffold	Position	Amplicon size	Female specificity		
					<i>S. h</i>	<i>S. b</i>	<i>S. h x S. b</i>
GAPDH	Forward	KL251991 (<i>S. haematobium</i>) SBOI.contig.33617.2504 (<i>S. bovis</i>)	15,936–16,493	558 bp	No	No	No
	CGACCATTGATGCAGCTAAA						
	Reverse		1,000–1,557				
WSh1	Forward	KL253191	39–225	187 bp	Yes	NA	Yes
	GCGTTCGTTTAAAACATCG						
	Reverse						
WSh2	Forward	KL252440	84–322	239 bp	Yes	NA	Yes
	GAATCGATGACACTGGCGTA						
	Reverse						
WShSb1	Forward	KL252782	3,138–3,334	197 bp	Yes	Yes	Yes
	CCACTAGAGTCGTCGTCGTG						
	Reverse						
WShSb2	Forward	KL252782	8,258–8,487	230 bp	Yes	Yes	Yes
	GTTGAAATTCGCTGCTGGAT						
	Reverse						
WShSb3	Forward	KL252440	18,445–18,637	193 bp	Yes	Yes	Yes
	GGTGGTCAGGCATTGATTCT						
	Reverse						

NA: no amplification. *S. h*: *Schistosoma haematobium*. *S. b*: *Schistosoma bovis*

doi:10.1371/journal.pntd.0005138.t002

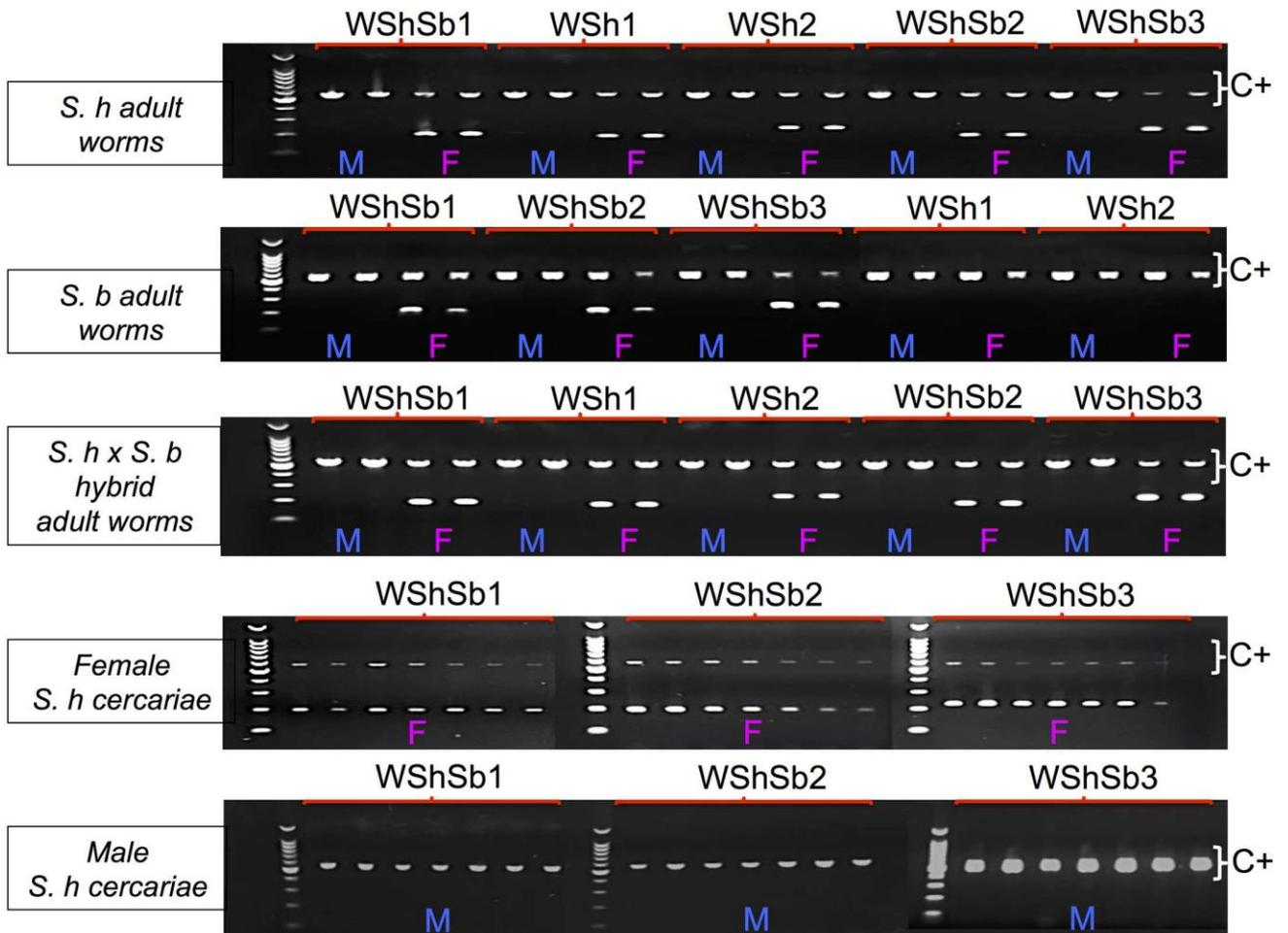
Female-specific amplicons were sent for sequencing (Genoscreen, Lille, France) for each target species.

Real-time quantitative PCR to test the efficiency of primers

Reactions were performed on pools of 3 females of *Schistosoma haematobium* or *Schistosoma bovis* using technical triplicates. The reaction mixture of a final volume of 10 µl consisted of standard reaction mix (Takyon SYBR assays; 1x), 1 µM of each primer and DNA template. The cycling protocol was: an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 10 s), annealing (56°C for 20 s) and extension (72°C for 25 s). Primer efficiencies was calculated using the slope of the standard curve on serial dilutions from 100 ng to 0.4 ng with efficiency = $-1 + 10^{(-1/\text{slope})}$.

Ethics Statement

All experiments on hamsters were carried out according to national ethical standards established in the writ of February 1st, 2013 (NOR: AGRG1238753A), setting the conditions for approval, planning and operation of establishments, breeders and suppliers of animals used for scientific purposes and controls. The French Ministry of Agriculture and Fishery



M: Males F: Females C+: Positive control band (GAPDH)

Fig 1. Diagnostic PCR assay of female-specific markers in males and females *Schistosoma haematobium* (*S. h*), *Schistosoma bovis* (*S. b*) and their hybrids. The first three gels correspond to PCR amplifications on adult worms (biological duplicates for males and females) of the 5 female specific markers identified with our *in silico* approach. Note that upper-bands correspond to the *GAPDH* gene control (558 bp), whereas lower bands correspond to female-specific amplification (see Table 2 for amplicon sizes). Note also that amplification is not effective for amplification from the genome of *S. bovis* using the two markers WSh1 and Wsh2. The last two gels show sex-specific amplification for the three markers, efficient in both species on a batch of cercariae from molluscs mono-miracidially infected with *S. haematobium*.

doi:10.1371/journal.pntd.0005138.g001

(Ministère de l'Agriculture et de la Pêche), and the French Ministry for Higher Education, Research and Technology (Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie) approved the experiments carried out for this study and provided permit A66040 for animal experimentation. The investigator possesses the official certificate for animal experimentation delivered by both ministries (Décret n° 87-848 du 19 octobre 1987; number of the authorization 007083).

Results

Sixty primer couples were designed and tested in this study. None of the primers designed on genome of *S. bovis* gave significant sex-specific results. Concerning primers designed on *S. haematobium* genome, we identified 5 female specific sequences for pure *S. haematobium* as well

as for the hybrid form of the parasite, 3 of which can also discriminate female from male individuals in *S. bovis* (Table 2, Fig 1, and S2 Fig). Three different scaffolds of *S. haematobium* genome were identified as being at least in part restricted to females and thus W-chromosome specific (KL252782, KL253191, KL252440). The *GAPDH* gene (control) was retrieved from both *S. haematobium* and *S. bovis* genomes, whereas none of the sex-specific markers were detected in the *S. bovis* draft assembly. The results of PCR amplification of these markers are presented in Fig 1. The correspondence between the sexes of *S. haematobium* cercariae determined by PCR, and the observation of these parasites as adult worms following hamster perfusion confirmed the reliability of our approach. Furthermore, we tested the efficiencies of our primers using real-time quantitative PCR, and obtained efficiencies around 100% for all primer couples with a single peak in melting curves. DNA amplification was still detectable below 30 Ct for 1.5 ng of DNA template for all markers. The sequenced amplicons (S1 File) were always identical between *S. haematobium* and the hybrid from Corsica. The sequences were highly conserved with *S. bovis* (100% identical for WShSb3, 97% and 97,4% for WShSb1 and WShSb2, respectively (S2 File)).

Discussion

In the present work, we used massive sequencing data from a field *S. haematobium* x *S. bovis* hybrid schistosome strain, allowing us to successfully identify 5 female-specific markers on 3 different scaffolds from the draft genome of *S. haematobium*, thus corresponding to previously unplaced W-specific regions. No sex marker candidates were confirmed by PCR when they were selected based on reads aligned against the genome of *S. bovis*. Furthermore, we could not locate the female-specific markers originating from the *S. haematobium* draft genome in the *S. bovis* genome. This can be explained by the relatively poor quality of the present genome for *S. bovis*, which emphasises the need to improve the assembly. Despite this, among 5 female-specific sex markers in *S. haematobium*, 3 can also be used for *S. bovis*. The conservation of three of the markers for *S. bovis* females was expected due to the close relatedness of both species, which are in the same monophyletic group [12]. The two markers, Wsh1 and Wsh2, did not amplify either female or male in *S. bovis*. All of the markers are functional for the *S. haematobium* x *S. bovis* hybrid and identical to the *S. haematobium* sequence, which is consistent with current work in our laboratory that suggests higher levels of introgression of *S. haematobium* than *S. bovis* in the hybrid schistosome from Corsica.

We first tested existing molecular sex markers designed for *S. mansoni* [18] on *S. bovis* and *S. haematobium* parasites, but no amplification was achieved. The sex-specific markers identified in the present study were also tested on 2 males and 2 females *S. mansoni*, and could not amplify any sequence. *S. mansoni* does not belong to the *S. haematobium* group but to another monophyletic group of *Schistosoma* (referred to as *S. mansoni* group) [12]. The fact that sex chromosome structure, inferred by C-banding method, is known to be different among schistosome species may explain the absence of cross-group amplification [4]. Further investigations are also needed to test whether these sex markers are applicable to other species of the *S. haematobium* group. Indeed, the *Schistosoma* genus harbours a high diversity of species, and the *S. haematobium* group is the most diverse and includes 3 species that infect humans (i.e. *S. haematobium*, *S. intercalatum*, and *S. guineensis*) and 6 species infecting animals (*S. bovis*, *S. curassoni*, *S. kisumuensis*, *S. leiperi*, *S. margrebowiei* and *S. mattheei*), mainly ruminants and/or rodents. Interestingly, species of the *S. haematobium* group have frequently been incriminated in hybridization phenomena. Natural hybrids have been observed between schistosome species infecting humans (i.e. *S. haematobium* x *S. intercalatum* [30,31], *S. haematobium* x *S. mansoni* [32], *S. haematobium* x *S. guineensis* [33,34], between schistosome species infecting

animals (*S. bovis* x *S. curassoni* [35,36] and between both, humans and animal infecting schistosomes (*S. mansoni* x *S. rodhaini* [37,38], *S. haematobium* x *S. bovis* [11,35,39], *S. haematobium* x *S. matthei* [40], *S. haematobium* x *S. curassoni* [35]). These last crosses are particularly important because they raise a risk of animal reservoir hosts and zoonotic transmission. A possible way of distinguishing these hybrid forms from pure parasites would be to use both mitochondrial (*cox1*) and nuclear (e.g., ITS) markers. In addition, being able to rely on sex-specific markers for such species will enable the identification of sex of the clonal cercariae pool proposed for hamster infection, and therefore will offer the opportunity to better characterise the ecological and medical impacts of schistosome hybrids. Another interesting aspect to be developed using such sex-markers would be to create a linkage map for *S. haematobium* and *S. bovis*, as has been achieved for *S. mansoni* [41].

Finally, the sex markers we have identified might be used to study sex-specific population structures of schistosome larvae in the field. Such sex specific structures with males being more randomly distributed than females has been observed for *S. mansoni* [42]. Our sex markers would allow the testing of bias dispersal in larval populations of *S. haematobium* or of *S. bovis*.

To conclude we demonstrate throughout this work that comparing male and female genomic data is relatively straightforward and could offer a reliable way of identifying sex-specific sequences. These markers are essential for experimental crosses and to design appropriate protocols for studying schistosome species within the *S. haematobium* group which are currently of great concern in a context of disease emergence both in Africa and Europe.

Supporting Information

S1 Fig. Visualisation with IGV of reads aligned against *S. haematobium* scaffold KL252782.

- Female (a) and male (b) reads aligned against *S. haematobium* x *S. bovis* concatenated genome using pre-set parameters.

- Female (c) and male (d) reads aligned against *S. haematobium* x *S. bovis* concatenated genome using unique read alignment.

Female specific sequences are easily recognisable and selected regions (red) were confirmed with our end-point PCR approach.

(TIF)

S2 Fig. Diagnostic PCR assay of female-specific markers in additional males and females individuals of *Schistosoma haematobium*, and *Schistosoma bovis* adult worms.

The top panel corresponds to PCR amplifications of female-specific markers from 6 females and 5 males of *Schistosoma haematobium*. All five sex markers are efficient in distinguishing male from female individuals. The bottom panel corresponds to PCR amplification of the 3 sex markers also efficient in *Schistosoma bovis*. Five males and 5 females were readily distinguished using primers WShSb1, WShSb2 and WShSb3. Note that the upper bands correspond to the *GAPDH* gene control (558 bp), whereas lower bands correspond to female-specific amplifications (see Table 2 for amplicon sizes).

(TIF)

S1 File. Fasta format sequences of the female-specific amplicons in each target species (ref: *Schistosoma haematobium* reference genome, Sh: *Schistosoma haematobium*, Sb: *Schistosoma bovis*, hyb: hybrid from Corsica).

(FASTA)

S2 File. Multiple sequence alignment of female-specific amplicons (ref: *Schistosoma haematobium* reference genome, Sh: *Schistosoma haematobium*, Sb: *Schistosoma bovis*, hyb: hybrid from Corsica).

hybrid from Corsica).
(DOC)

Acknowledgments

We would like to thank Cécile Saint-Béat, and Nathalie Arancibia for rodent and snail maintenance. We also acknowledge the contribution of the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montréal, Canada.

Author Contributions

Conceptualization: ET JB.

Formal analysis: JKS.

Investigation: JKS JFA JB.

Project administration: ET JB.

Resources: FDT AO JB.

Supervision: ET.

Visualization: JKS.

Writing – original draft: JKS.

Writing – review & editing: JB AO FDT ET.

References

1. King CH. Parasites and poverty: The case of schistosomiasis. *Acta Tropica*. 2010. pp. 95–104.
2. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*. 2000; 77: 41–51. PMID: [10996119](#)
3. Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop*. 2002; 82: 139–146. PMID: [12020886](#)
4. Grossman a I, Short RB, Cain GD. Karyotype evolution and sex chromosome differentiation in Schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae). *Chromosoma*. 1981; 84: 413–30. PMID: [7327052](#)
5. Basch PF. Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitol Today*. 1990; 6: 160–163. PMID: [15463329](#)
6. Loker ES, Brant S V. Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends Parasitol*. 2006; 22: 521–528. doi: [10.1016/j.pt.2006.09.001](#) PMID: [16979940](#)
7. Holtfreter MC, Moné H, Müller-Stöver I, Mouahid G, Richter J. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Eurosurveillance*. 2014; 19.
8. Berry A, Fillaux J, Martin-Blondel G, Boissier J, Iriart X, Marchou B, et al. Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Eurosurveillance*. 2016; 21.
9. Boissier J, Moné H, Mitta G, Bargues MD, Molyneux D, Mas-Coma S. Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infect Dis*. Elsevier; 2015; 15: 757–8. doi: [10.1016/S1473-3099\(15\)00084-5](#) PMID: [26122434](#)
10. Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, Allienne J-F, Huysse T, Mas-Coma S, et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect Dis*. 2016; 3099: 1–9.
11. Moné H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsá-Nguéma R, Ibikounlé M, Boissier J, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol Res*. 2015; 114: 4127–4133. doi: [10.1007/s00436-015-4643-4](#) PMID: [26268566](#)
12. Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA, Rollinson D. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasit Vectors*. 2011; 4: 131. doi: [10.1186/1756-3305-4-131](#) PMID: [21736723](#)

13. King KC, Stelkens RB, Webster JP, Smith DF, Brockhurst MA. Hybridization in Parasites: Consequences for Adaptive Evolution, Pathogenesis, and Public Health in a Changing World. *PLoS Pathog.* 2015; 11: 1–12.
14. Webster BL, Southgate VR. Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology.* 2003; 127: 231–242. PMID: [12964826](#)
15. Boissier J, Durand P, Moné H. PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: Application for sexing clonal cercarial populations. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 112: 139–141. PMID: [11166395](#)
16. Chevalier FD, Le W, Carolina A, Mattos A De, Loverde PT. Real-time PCR for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae. *Mol Biochem Parasitol.* Elsevier B.V.; 2016; 205: 35–38. doi: [10.1016/j.molbiopara.2016.03.010](#) PMID: [27021570](#)
17. Gasser RB, Morahan G, Mitchell GF. Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1991; 47: 255–258. PMID: [1944422](#)
18. Portela J, Grunau C, Cosseau C, Beltran S, Dantec C, Parrinello H, et al. Whole-genome in-silico subtractive hybridization (WISH) using massive sequencing for the identification of unique and repetitive sex-specific sequences: the example of *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics.* 2010; 11: 387. doi: [10.1186/1471-2164-11-387](#) PMID: [20565937](#)
19. Théron a, Pages JR, Rognon a. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Exp Parasitol.* 1997; 85: 1–9. doi: [10.1006/expr.1996.4106](#) PMID: [9024196](#)
20. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2003; 91: 144–150. doi: [10.1007/s00436-003-0943-1](#) PMID: [12910415](#)
21. Boissier J, Rivera ER, Moné H. Altered behavior of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 2003; 89: 429–433. doi: [10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0429:ABOTSB\]2.0.CO;2](#) PMID: [12880237](#)
22. Silva ML, Vicente FS, Avelino IC, Martin VR. Susceptibility of *Planorbarius metidjensis* from Portugal and Spain to *Schistosoma bovis* from Salamanca, Spain. *Malacologia.* 1977; 16: 251–254. PMID: [904368](#)
23. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal.* 2011; 17: 10.
24. Young ND, Jex AR, Li B, Liu S, Yang L, Xiong Z, et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat Genet.* 2012; 44: 221–225. doi: [10.1038/ng.1065](#) PMID: [22246508](#)
25. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg S. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009; 10: R25. doi: [10.1186/gb-2009-10-3-r25](#) PMID: [19261174](#)
26. Xie C, Tammi MT. CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing. *BMC Bioinformatics.* 2009; 10: 80. doi: [10.1186/1471-2105-10-80](#) PMID: [19267900](#)
27. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013; 14: 178–192. doi: [10.1093/bib/bbs017](#) PMID: [22517427](#)
28. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000; 132: 365–386. PMID: [10547847](#)
29. Beltran S, Galinier R, Allienne JF, Boissier J. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103: 501–503. PMID: [18797767](#)
30. Southgate VR, Wijk HB, Wright CA. Schistosomiasis at Loum, Cameroun; *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their natural hybrid. *Zeitschrift für Parasitenkd.* 1976; 49: 145–159.
31. Burchard GD, Kern P. Probable hybridization between *S. intercalatum* and *S. haematobium* in western Gabun. *Trop Geogr Med.* 1985; 37: 119–123. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4035773> PMID: [4035773](#)
32. Huyse T, Van den Broeck F, Hellems B, Volckaert FAM, Polman K. Hybridisation between the two major African schistosome species of humans. *Int J Parasitol.* Australian Society for Parasitology Inc.; 2013; 43: 687–689. doi: [10.1016/j.ijpara.2013.04.001](#) PMID: [23643461](#)
33. Webster BL, Tchuem Tchuenté LA, Jourdan J, Southgate VR. The interaction of *Schistosoma haematobium* and *S. guineensis* in Cameroon. *J Helminthol.* 2005; 79: 193–197. PMID: [16153312](#)
34. Moné H, Minguez S, Ibikounlé M, Allienne J- F, Massougbodji A, Mouahid G. Natural Interactions between *S. haematobium* and *S. guineensis* in the Republic of Benin. *ScientificWorldJournal.* 2012; 2012: 793420. doi: [10.1100/2012/793420](#) PMID: [22645454](#)

35. Webster BL, Diaw OT, Seye MM, Webster JP, Rollinson D. Introgressive Hybridization of *Schistosoma haematobium* Group Species in Senegal: Species Barrier Break Down between Ruminant and Human Schistosomes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7.
36. Rollinson D, Southgate VR, Vercruyse J, Moore PJ. Observations on natural and experimental interactions between *Schistosoma bovis* and *S. curassoni* from West Africa. *Acta Trop*. 1990; 47: 101–114. PMID: [1969699](#)
37. Morgan J a T, DeJong RJ, Lwambo NJS, Mungai BN, Mkoji GM, Loker ES. First report of a natural hybrid between *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. *J Parasitol*. 2003; 89: 416–418. doi: [10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0416:FROANH\]2.0.CO;2](#) PMID: [12760671](#)
38. Steinauer ML, Hanelt B, Mwangi IN, Maina GM, Agola LE, Kinuthia JM, et al. Introgressive hybridization of human and rodent schistosome parasites in western Kenya. *Mol Ecol*. 2008; 17: 5062–5074. doi: [10.1111/j.1365-294X.2008.03957.x](#) PMID: [18992007](#)
39. Huyse T, Webster BL, Geldof S, Stothard JR, Diaw OT, Polman K, et al. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathog*. 2009; 5.
40. Pitchford RJ. Observations on a possible hybrid between the two schistosomes *S. haematobium* and *S. matthei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1961; 55: 44–51. PMID: [13736090](#)
41. P Criscione CD, Valentim CLL, Hirai H, LoVerde PT, Anderson TJC. Genomic linkage map of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Genome Biol*. 2009; 10: R71. doi: [10.1186/gb-2009-10-6-r71](#) PMID: [19566921](#)
42. Prugnolle F, De Meeûs T, Durand P, Sire C, Théron A. Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: Evolutionary and epidemiological implications. *Mol Ecol*. 2002; 11: 1231–1238. PMID: [12074730](#)

2) Choix sexuels entre *S. haematobium* et *S. bovis* et influence de l'appariement sur le transcriptome des mâles et femelles

- **Publication :** Julien Kincaid-Smith, Cristian Chaparro, Marta Reguera-Gomez, Stephen Mulero, Jean-Francois Allienne, Eve Toulza, Jérôme Boissier. Pre-zygotic isolation mechanisms between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites: from mate interactions to differential gene expressions

Note à l'attention des lecteurs : il s'agit ici d'une version préliminaire du manuscrit qui demandera un travail de rédaction plus approfondi avant soumission.

Afin de déterminer l'occurrence potentielle du phénomène d'hybridation entre *S. haematobium* et *S. bovis* en milieu naturel, nous avons évalué les choix et niveaux de compétition sexuels de ces parasites. En effet, les espèces développent généralement des mécanismes d'isolement reproducteur limitant les croisements interspécifiques. Or, ces mécanismes d'isolement pré- et post-zygotiques sont peu étudiés chez les parasites. Concernant les espèces du genre *Schistosoma*, l'étude de leurs choix sexuels a permis de mettre en évidence des espèces ayant une préférence pour l'appariement homospécifique alors que d'autres s'apparient aléatoirement. Dans cette dernière situation l'occurrence du phénomène d'hybridation peut donc être renforcée en zones sympatriques lorsque les individus se retrouvent au sein du même hôte. Chez les schistosomes la spécificité d'hôte et l'isolement reproducteur «par l'hôte» peut être si efficace que les espèces peuvent ne pas en avoir mis en place d'autres barrières reproductives. Ceci implique que si la spécificité d'hôte est rompue, les espèces peuvent alors facilement s'hybrider. *S. haematobium* est une espèce spécifique de l'homme et est localisée au niveau du plexus péri-vésical alors que *S. bovis* est une espèce parasitant les bovins et qui est localisée au niveau du système veineux mésentérique. Pendant longtemps on pensait que les lieux de vie des schistosomes (tropisme) empêcherait la rencontre et donc l'hybridation entre ces espèces ce qui se révèle être faux aujourd'hui au vu des nombreux hybrides retrouvés sur le terrain. Bénéficiant de marqueurs du sexe développés précédemment, nous avons donc pu mettre place un protocole expérimental d'infections croisées entre mâles et femelles des deux espèces afin de déterminer les choix sexuels de ces deux espèces. Compte tenu de l'interdépendance forte entre mâles et femelles chez les schistosomes, pour leur nutrition, leur maturité sexuelle, et leur reproduction nous avons également analysé l'influence de l'appariement (homo vs. hétérosécificité) sur le profil transcriptomique des mâles et des femelles. Les

résultats montrent que les appariements homo- et hétérospécifique se produisent de manière aléatoire entre ces deux espèces. Ceci suggère que le choix du partenaire sexuel n'est pas un facteur limitant l'hybridation. Il est également intéressant de noter que peu de gènes sont affectés par l'appariement hétérospécifique et que ces derniers sont en partie liés à la sexualité et aux interactions entre les sexes.

Pre-zygotic isolation mechanisms between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites: from mating interactions to differential gene expression

Julien Kincaid-Smith¹, Cristian Chaparro¹, Marta Reguera-Gomez², Stephen Mulero¹, Jean-Francois Allienne¹, Eve Toulza¹, Jérôme Boissier^{1*}

* Corresponding author

¹ Univ. Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France.

² Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, Valencia, Spain.

Abstract

Species usually develop reproductive isolation mechanisms allowing them to avoid interbreeding. These preventive barriers can act before reproduction “pre-zygotic barriers”, limiting unfavourable matings, or during the life cycle, “post-zygotic barriers”, determining the viability and selective success of the hybrid offspring. Parasite hybridization and the underlying reproductive isolation mechanisms allowing them to maintain their genetic integrity have poorly been explored and are still misunderstood. Using an integrated approach this work aims to quantify the relative importance of pre-zygotic barriers in *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis* crosses. These two co-endemic species causing schistosomiasis, one of the major debilitating parasitic diseases worldwide seem importantly hybridize naturally. Using mate choice experiments we have first tested if a specific mate recognition system exists between both species. Second, using RNA-sequencing we have analysed differential gene expression between homo- and heterospecific pairing in male and female adult parasites. We show that - and heterospecific pairing occurs randomly between these two species, and few genes in both sexes are affected by heterospecific pairing. This suggests that i) the choice of mate is not a reproductive isolating factor, and that ii) no pre-zygotic barrier except spatial isolation “by the host” seems to limit interbreeding between these two species. Interestingly, the genes affected by the pairing status of the worms can be related to pathways affected during male and female interactions and may also present interesting candidates for species isolating mechanisms and hybridization in schistosome parasites.

Introduction

Usually species cannot interbreed. A subset of obstacles has evolved in the course of speciation in order to limit gene flow via hybridization and maintain species boundaries. These obstacles are traditionally classified as pre- and post-zygotic barriers (also known as pre- or post-mating barriers) and can be defined as any mechanisms preventing or reducing gene flow between groups of potentially interbreeding individuals [1]. Pre-zygotic barriers include spatial isolation (two species live in different habitats or geographical zones), behavioural isolation (individuals can choose to mate with individual of their own species), temporal isolation (copulation does not occur at the same time e.g. different season) mechanical isolation (sex organs are not compatible) and gametic isolation (the gametes encounters but fertilization does not occur). When the first barrier is crossed, post-zygotic isolation mechanisms can arise to prevent gene flows. Post-zygotic barriers include hybrid unviability (hybrids dies prematurely), reduced fitness with low fertility (hybrids are poorly fertile or infertile) or hybrid breakdown (a longer process where the hybrids lines are counter selected because they are less viable than their parental forms). The strength and/or the order of each barrier are variable among species making difficult to predict the evolution of reproductive isolation mechanisms [2]. Moreover, reproductive isolation is often the result of an accumulation and interaction of multiple pre- and post-zygotic mechanisms restricting most genetic flow [3]. However, it is generally admitted that the pre-zygotic isolation barriers are enhanced in sympatric species [4] and are the most effective because they act early to prevent producing unselected progeny [5].

Despite their importance in term of biodiversity [6] and animal or human health parasite species have received less attention than free living organisms both in terms of hybridization and understanding the role of pre- or post-zygotic mechanisms in their reproductive isolation [7]. The pre-zygotic barriers usually include additional and stronger obstacles to overcome compared to free living organisms. For instance, the "habitat barrier" includes both the geographic area and the infection of the same host. For parasites, a host is an inimical habitat imposing strong selective pressures (co-evolutionary arm race) requiring constant adaptation of the parasites for the completion of its life cycle. The specialisation of parasite species to a particular host is thus a strong pre-zygotic isolation mechanisms shaped through its hosts potentially preventing hybridization and favouring speciation. However some related species manage to retain their genetic identity while parasitizing the

same host, meaning that they have acquired selective mechanisms for reproductive isolation. Hybridization and pre-zygotic reproductive barriers has been studied on very few parasite models: plasmodium, cestodes and schistosomes. Partial pre-zygotic barriers have been evidenced between *Plasmodium berghei* and *P. yoeli* [8]. It was not the case between *Schistocephalus solidus* and *S. pungitii* [7], despite their strong intermediate host specificity suggesting in this last case that post-zygotic selection against hybrids is presumably the more important driving force limiting gene flow between these two parasite sister species [7].

Schistosomes are among the worlds greatest concerns in terms of human and animal health because they cause schistosomiasis a debilitating disease affecting over 230 million of people in the world [9]. There are currently 6 *Schistosoma* species infecting humans and 19 species infecting animals [10]. These parasites have a two-host life cycle, which includes a mammalian definitive host in which sexual reproduction occurs and a mollusc intermediate host in which asexual multiplication takes place. Schistosomes have the particularity of having separate sexes among other trematodes [11,12] and have therefore been intensively studied for their sexual features including male-female interactions [13,14], sex-ratio (Boissier and Moné 2000; Sophie Beltran and Boissier 2010), mating system [17,18] and mating behaviour [19]. One direct consequence of dioecism in schistosomes is the necessity of individuals of both sexes to infect the same definitive host. This constraint can lead to interaction of species infecting the same host, and in the case of porous reproductive pre-zygotic barriers to hybridization. Indeed, several hybrid schistosomes have been evidenced and like in several other clades the isolation mechanisms increase with divergence time between taxa [4,10]. Interspecific sexual interactions result either in hybridization (i.e. genetic introgression) or parthenogenesis depending on the phylogenetic distance of the species [20]. To conserve their genetic identity, schistosomes that inhabit the same definitive host have acquired pre-zygotic isolating mechanisms. Among these barriers, habitat and behavioural isolation have a great interest in schistosome's sexual interactions. First habitat isolation is a three level constraint that initially has to be overcome: the geographic area, same host and same localisation in the host. Indeed schistosomes species are distributed worldwide (the majority in Africa), the vertebrate host specificity depends on the parasite species, and while the majority of species live in the mesenteric, one species (*S. haematobium*) lives in the veins surrounding the bladder of humans. Second, behavioural

isolation is more complex in schistosomes than in other species because mate choice is followed by a pairing dependent differentiation of the female sexual organs [13,14]. Studies have clearly established that the presence of the male is necessary not only for the female sexual development but also for the maintenance of sexually mature and active state and does not depend upon species-specific pairing [21–23]. Thus, an intimate and permanent association between sexes is necessary for reproduction to occur and involves both physical and chemical transfers. This exchange is not unidirectional, and while males transfer glucose and lipid secretions to females, females also release factors affecting male worms physiology [24–27]. Studies on Schistosomes mating choices have revealed that depending on the parasite species some combinations readily pair (*S. haematobium* x *S. intercalatum* and *S. bovis* x *S. curassoni*, *S. mansoni* x *S. haematobium*), will whereas others may be more selective and present mate choice systems (*S. mansoni* x *S. intercalatum*, *S. haematobium* x *S. mattheii*, and *S. mansoni* x *S. margrebowiei* crosses [28–31]). In the former case and for many related species capable of hybridising host specificity may be the sole barrier preventing interbreeding. This isolation mechanism ‘by the host’ may be so efficient that species may lack any post-zygotic or other pre-zygotic mechanisms ultimately allowing them hybridize when the opportunity arises. Therefore, the lack of reproductive incompatibility between schistosome species infecting humans and animals may facilitate gene flow if the host isolating barriers are broken down.

S. haematobium x *S. bovis* hybrids are today the most studied hybrid form of schistosomes. These hybrids have first been identified in Niger by Brémont [32] and more recently in Senegal [33] and we believe they are widely distributed in west-Africa [32–35]. Moreover, this hybrid cross has recently been responsible for a large-scale outbreak in Europe (Corsica, France), where transmission of the disease is persistent [35–37]. Pre-zygotic habitat barrier has been broken. *S. haematobium* and *S. bovis* are co-endemic in Africa, but their tropism is different (veins surrounding the bladder for *S. haematobium* vs. mesenteric veins *S. bovis*) and their definitive hosts are also different. *S. haematobium* is a mainly a parasite of human. However, sporadic studies have shown that non Human primates, cetartiodactyla or rodents could be naturally infected by this parasite species [38–40]. Conversely, *S. bovis* is mainly a parasite of ruminant with sporadic cases of rodent infection [38]. Interestingly recent studies suggest that co-endemic *S. haematobium* and *S. bovis* species can naturally infect

the same rodent hosts in Africa, and that they may be the hosts in which hybridization occurs [41]. Hybridization between these two species is particularly worrying because it raises the eventuality for a human parasite to become zoonotic but also because it may lead to a change in the response of the parasites to chemotherapeutic treatment [42]. Also these hybrids often display heterosis, in which their outperformed parental species [10,33,34]. Importantly the existence of a mate recognition system between the two species would mitigate against natural occurrences of hybridisation in sympatric areas. At the contrary lack of reproductive isolation could indicate that occurrences of hybridization may be strong.

This study proposes an integrated approach, from mating behaviour to male and female gene expression, in order to quantify the relative importance of pre-zygotic barriers in *S. haematobium* x *S. bovis* crosses. First, using a mate choice experiment we test if specific mate recognition exists. Second, given the strong interdependence between male and female schistosomes, we also analysed the influence of pairing (homo- vs heterospecific) on the transcriptomic profile of males and females parasite using RNA sequencing. The molecular determinants of the very first step towards hybridization may give further insight into the permeability of the two species and reveal some important genes linked to male and female interaction, species isolating genes and schistosomes hybridization.

Materiel and methods

Ethics Statement

Experiments were carried out according to national ethical standards established in the writ of February 1st, 2013 (NOR: AGRG1238753A), setting the conditions for approval, planning and operation of establishments, breeders and suppliers of animals used for scientific purposes and controls. The French Ministry of Agriculture and Fishery (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche), and the French Ministry for Higher Education, Research and Technology (Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie) approved the experiments carried out for this study and provided permit A66040 for animal experimentation. The investigator possesses the official certificate for animal experimentation delivered by both ministries (Décret n° 87-848 du 19 octobre 1987; number of the authorization 007083).

Parasite species and experimental infections

S. haematobium and *S. bovis* were maintained in the laboratory on *Bulinus truncatus* snails as intermediate hosts and *Mesocricetus auratus* as definitive hosts. The species strains used here originate from Cameroon and Spain for *S. haematobium* and *S. bovis*, respectively [43]. In this work we have i) performed mating choice, ii) force interbreeding between both species in laboratory hosts (*Mesocricetus auratus*). Experimental infections of hamsters with mixed combinations of both species in controlled proportions were performed after sexing procedure of the cercariae emitted by individually infected molluscs [43]. Briefly, *Bulinus truncatus* molluscs were individually exposed to 1 miracidium of *S. haematobium* or *S. bovis*. After a minimum of thirty-five days after exposing the molluscs to the parasites, successfully infected molluscs released either male or female clonal populations of cercariae of each species. After collecting cercariae from each individual molluscs and proceeding to molecular sexing procedure as described previously [43], these molluscs were classified as releasing male or female cercariae of a specific species (*S. haematobium* or *S. bovis*) and were used for the subsequent experiments (Figure 1).

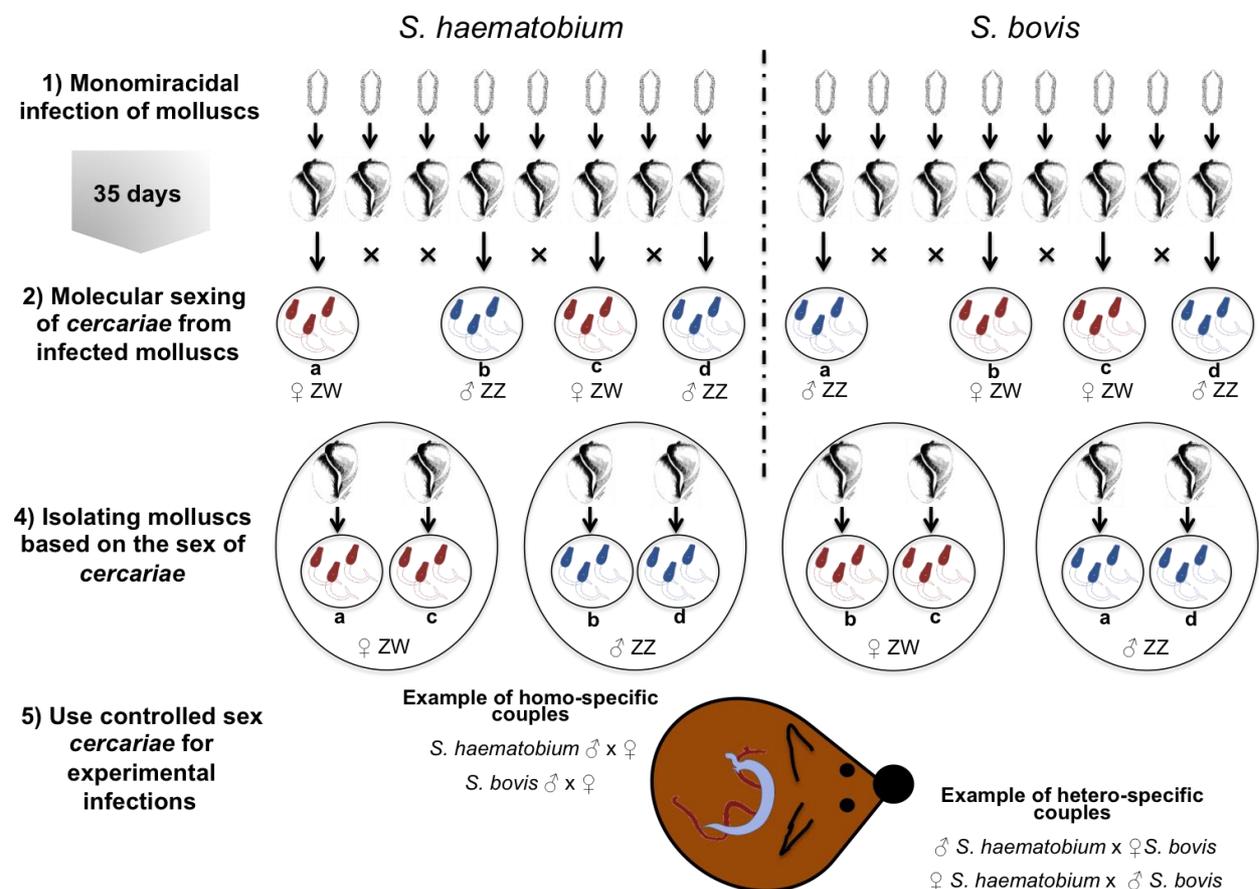


Figure 1: Schematic representation of experimental infection procedure

Hamsters were infected with mixed combinations of *cercariae* by surface application method for 1 hour. Detailed methods employed for molluscs and rodents infections were described previously [44–46]. The proportion of the *cercariae* used for each infestations are presented in **Table 1**. The experimental design of this work was set for two objectives, i) assess the species mating choices and competition by quantifying the frequency of hybridization, ii) force reciprocal hybridization and assess the transcriptomic changes occurring between homospecific and heterospecific males and females. According to the first objective of this work, 5 hamsters were infected with mixed combinations of *cercariae* species (**Table 1**). Experiments 1 to 4 represent a limited choice of mate (Exp. 1 and Exp. 3 male choice - Exp. 2 and Exp. 4 female choice). In these last experiments the excess of one sex ensures that all individuals of the other sex will be mated (**Table 1**). Experiment 5 represents species full choice and is performed using the same number of *cercariae* of both sexes and both species. According to our second objective, and serving as an infection rate control, homospecific and heterospecific control experiments 1 and 2 presented in **Table 1**, are simultaneous infections without mate choice and are used to infer the transcriptomic profiles of homospecific and heterospecific paired worms (**Table 1**).

Table 1: Experimental procedure to evaluate sexual interactions between *S. haematobium* and *S. bovis* parasites.

Experiments	<i>S. haematobium</i>		<i>S. bovis</i>		Biological replicates
	Males	Females	Males	Females	
1	150	225	-	225	5
2	225	150	225	-	5
3	-	225	150	225	5
4	225	-	225	150	5
5	150	150	150	150	5
Homo control 1	300	300	-	-	6
Homo control 2	-	-	300	300	6
Hetero control 1	300	-	-	300	6
Hetero control 2	-	300	300	-	6

Three months after exposing hamsters to *cercariae*, the number of single and homospecific versus heterospecific paired worms was assed after recovering worms by portal perfusion of the hamsters [46], separating couples and individualizing each partner in 96 well plates. Each worm and their status (paired, or single) as well as their sex (male or female) was carefully assigned.

DNA extraction and species diagnostic multiplex PCR

The worms collected were subject to DNA extraction using a hot shot extraction method [47]. To identify the species of each worm we used a rapid diagnostic procedure based on multiplex PCR reaction enabling the distinction between *S. haematobium* and *S. bovis* [48,49]. Briefly, the reaction is composed of a universal forward primer and two specific reverse primers targeting either *S. haematobium* or *S. bovis* COX1 gene. In presence of *S. haematobium* DNA the amplicon size is of 543 bp whereas in the presence of *S. bovis* DNA the amplicon size is of 306 bp allowing discriminating *S. haematobium* from *S. bovis* parasites (Table 2).

Table 2: RD-PCR primer sequences and amplicon size [50,51].

Target species primer	Sequence (3'-5')	Amplicon size
Universal	-TTTTTTGGTCATCCTGAGGTGTAT-	
<i>S. haematobium</i>	-TGATAATCAATGACCCTGCAATAA-	543bp
<i>S. bovis</i>	-CACAGGATCAGACAAACGAGTACC-	306 bp

The PCR reactions were carried out in a total volume of 12.5 µl containing GoTaq Flexi Reaction Buffer (Promega), 1.5 mM of MgCl₂, 0.4 µM of each of the 3 primers (at 10 µM each), 0.2 µM of dNTP solution (at 10 µM each), 0.5 U of GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega, USA) and 1 µl of diluted DNA (1/10). The PCR program was: an initial denaturation phase at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30s, 58°C for 1.30s, 72°C for 1.30s, and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were examined on 1.5% agarose gels at 120V for 45 min and using a 100 bp DNA-Ladder (Promega) for size estimation.

Statistical analysis

After counting the number of homospecific pairs, heterospecific pairs and single worms of each species, we calculated the expected number of single and mated pairs according the null hypotheses of random pairing. Expected and observed numbers were then compared using either a Fisher exact test (experiments 1, 2, 3 and 4), or a Chi square test (experiment 5 and experiments 1, 2, 3 and 4 unanimously)

RNA extraction and sequencing of homo- and heterospecific *S. hamematobium* and *S. bovis* male and female pairs

After portal perfusion of the hamsters containing the homospecific and heterospecific worms (**Homo control 1 and 2, and Hetero control 1 and 2**), paired adult worms were isolated to constitute separately duplicates of homospecific males and females, and duplicates of heterospecific males and females. Pools of 10-12 worms were gathered in 2ml microtubes and immediately frozen in liquid nitrogen before they were stored at -80°C. TRIzol™ RNA extraction and subsequent paired-end Illumina HiSeq 4000 PE100 sequencing technology was performed on the samples. Briefly, pools of adult worms were subsequently grounded with two steel balls using Retsch MM400 cryobrush (2 pulses at 300Hz for 15s). Total RNA was extracted using the TRIzol™ Thermo Fisher Scientific protocol (ref: 15596018) slightly modified as each reagent volumes were halved. Total RNA was eluted in 44 µl of ultrapure water before undergoing a DNase treatment using ThermoFisher Scientific Turbo DNA-free kit TM. RNA was then purified on a column using the Qiagen RNeasy mini kit (ref: 74104) and eluted in 42µl of ultrapure water. Quality and concentration were assessed by spectrophotometry with the Agilent 2100 Bioanalyzer system and using the Agilent RNA 6000 nano kit (ref 5067-1511). Further details are available at Environmental and Evolutionary Epigenetics Webpage (<http://methdb.univ-perp.fr/epievo/>).

Illumina libraries construction and high-throughput sequencing

cDNA library construction and sequencing were performed by the Génome Quebec platform. The TruSeq stranded mRNA library construction kit (Illumina Inc., USA) was used following the manufacturer's protocol on 300 ng of total RNA per sample. Sequencing of the 24 samples was performed in 2x100 bp paired-end on a Illumina HiSeq 4000. Sequencing data are available at the NCBI-SRA under the BioProject PRJNA491632.

Transcriptomic analysis of heterospecific pairing vs. homospecific pairing effect

Raw sequencing reads were analysed on the web-based Galaxy framework [50,51] implemented on the local server of our laboratory. First, *S. haematobium* and *S. bovis* homo- and heterospecific sequencing reads were subjected to quality assessment and sequencing adaptor trimming. For this we used the set of tools based on FASTX-toolkit by

Assaf Gordon (Hannon laboratory—FASTX-Toolkit. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) [52], as well as Cutadapt program (Galaxy Version 1.16.1) to remove adapter sequences from Fastq files [53]. At last each samples reads were associated into pairs using the FASTQ interlacer/de-interlace programs (Galaxy Version 1.1).

Processed reads were mapped using RNA-star Galaxy Version 2.6.0b-1 [54] to the *S. haematobium* reference genome [55] downloaded from the Schistosoma Genomic Resources website SchistoDB (http://schistodb.net/common/downloads/Current_Release/ShaematobiumEgypt/fasta/data/). Exon-intron structure was thereafter reconstructed for each mapping BAM files using Cufflinks transcript assembly Galaxy Version 2.2.1.2, by setting the max intron length at 50000, but without any correction parameters [56]. Finally, in order to create a *de novo* reference transcriptome representative of *S. haematobium* and *S. bovis* male and female reads we joined all cufflinks data with Cuffmerge Galaxy Version 2.2.1.2 [56] without using any guide or reference. This enabled us to create a representative *de novo* reference transcriptome of both species and both sex using the same reference genome. The Genomic DNA intervals of each newly assembled genes of this *de novo* transcriptome was extracted from *S. haematobium* reference genome and converted into a *de novo* transcriptome Fasta file.

The number of reads per transcripts for each sample (*i.e.*, the read abundance representative of each gene) was quantified using HTseq-count Galaxy Version 0.9.1 on the *de novo* transcriptome, setting the overlap resolution mode on “union” [57]. Finally, we evaluated the differential gene expression levels between homospecific and heterospecific worms for each species and each sex separately using DESeq2 Galaxy Version 2.11.40.2 [58]. We carried out four types of comparisons: *S. haematobium* homospecific male vs *S. haematobium* heterospecific male, and *S. haematobium* homospecific female vs *S. haematobium* heterospecific female, as well as *S. bovis* homospecific male vs *S. bovis* heterospecific male, and *S. bovis* homospecific female vs *S. bovis* heterospecific female. Differential gene expression results were filtered on the adjusted *P*-value (Benjamini-Hochberg multiple testing based False Discovery Rate (FDR)) and considered significant when $\leq 5\%$.

Functional annotation

Using our BLAST local server we annotated entirely the *de novo* assembled transcriptome by Blastx search against the non-redundant database of the NCBI. We conserved only the longest unique transcript (TCONS) of each representative gene (XLOC) for Blastx search and subsequent analysis. Output XML files were used for gene ontologies (GO) mapping and annotation using Blast2Go version 4.1.9 [59]. Finally enrichment Fisher's exact tests were performed on up and down regulated set of genes focusing on biological process (BP) ontology terms. The *P-value* for significance was set to 5% False Discovery Rate (FDR).

Results

Mating choices

Details of the worms recovered from each hamster and whether they were paired or single are summarized for each experiment for *S. haematobium* (**Sh**) and *S. bovis* (**Sb**) in **Table 3-7**.

Experiment 1: *S. haematobium* male's choice

Two types of pairing were obtained in experiment 1, one being homospecific (♂ **Sh** x ♀ **Sh**) and one being heterospecific (♂ **Sh** X ♀ **Sb**). All the male worms (**Sh**) obtained were paired, and there was a surplus of unpaired females (♀ **Sh**, ♀ **Sb**) of both species (**Table 3**). The proportion of heterospecific pairs (n=68; 55% of couples) was significantly greater (p=0.0298) than homospecific pairs (n=55; 45% of couples). The proportion of paired females among *S. haematobium* was 28,7% (55 out of 192), compared to *S. bovis* that was of 51,1% (68 out of 133) showing that male *S. haematobium* was not limited in the homospecific choice.

Table 3. Summarized information of experiment 1 (*S. haematobium* male's choice). Number and identification of paired and unpaired worms recovered from each hamster exposed to 150 male *cercariae* of *S. haematobium*, 250 female *cercariae* of *S. haematobium* and 250 female *cercariae* of *S. bovis*. In brackets, expected number of couples regarding the total number of worms recovered for each species.

Hamster no.	♂ Sh X ♀ Sh	♂ Sh X ♀ Sb	♀ Sh	♀ Sb
1	11	14	20	9
2	11	22	15	11
3	14	16	25	4
4	9	6	36	26
5	10	10	41	15
TOTAL*	55 (73)	68 (50)	137	65

Experiment 2: *S. haematobium* female's choice

According to *S. haematobium* female's choice experiment 2, two types of pairings were obtained one being homospecific (♂ Sh x ♀ Sh) and one being heterospecific (♂ Sb x ♀ Sh). All the female (Sh) worms obtained were paired, and there was a surplus of unpaired males of both species (♂ Sh, ♂ Sb). In this experiment the proportion of homospecific pairs (n=56; 72%) was not significantly ($p=0.391$) different from heterospecific pairs (n=22; 28%) according to the number of expected homo- and heterospecific pairing (**Table 4**). The proportion of paired males among *S. haematobium* was of 61,5% (56 out of 91), compared to 42,3% (22 out of 52) for *S. bovis*.

Table 4. Summarized information of experiment 2 (*S. haematobium* female's choice). Number and identification of paired and unpaired worms recovered from each hamster exposed to 150 female *cercariae* of *S. haematobium*, 250 male *cercariae* of *S. haematobium* and 250 male *cercariae* of *S. bovis*. In brackets, expected number of couples regarding the total number of worms recovered for each species.

Hamster no.	♂ Sh x ♀ Sh	♂ Sb x ♀ Sh	♂ Sh	♂ Sb
1	10	2	7	5
2	6	1	0	1
3	12	3	11	10
4	16	3	6	2
5	12	13	11	12
TOTAL	56 (50)	22 (28)	35	30

Experiment 3: *S. bovis* male's choice

The number of paired worms recovered in experiment 3 was extremely low, due to premature death of two hamsters (**Table 5**). Two types of pairing were obtained in this experiment, one being homospecific ($\text{♂ Sb} \times \text{♀ Sb}$) and one being heterospecific ($\text{♂ Sb} \times \text{♀ Sh}$). All the male worms obtained were mated, and there was a surplus of unpaired females of both species (♀ Sh , ♀ Sb). The proportion of homospecific pairs (n=6; 67%) was not significantly ($p=0.637$) greater than heterospecific pairs (n=3; 33%) according to the number of expected homo- and heterospecific pairing **Table 5**. The proportion of paired females among *S. bovis* was 8,1% (6 out of 74) whereas that for *S. haematobium* was 3,3% (3 out of 91).

Table 5. Summarized information of experiment 3 (*S. bovis* male's choice). Number and identification of paired and unpaired worms recovered from each hamster exposed to 150 male *cercariae* of *S. bovis*, 250 female *cercariae* of *S. haematobium* and 250 female *cercariae* of *S. bovis*. In brackets, expected number of couples regarding the total number of worms recovered for each species.

Hamster no.	♂ Sb x ♀ Sb	♂ Sb x ♀ Sh	♀ Sh	♀ Sb
1	0	2	1	0
2	4	0	55	46
3	2	1	32	22
TOTAL	6 (4)	3 (5)	88	68

Experiment 4: *S. bovis* female's choice

Two types of pairing were obtained in experiment 4 (**Table 6**), one being homospecific ($\text{♂ Sb} \times \text{♀ Sb}$) and one being heterospecific ($\text{♂ Sh} \times \text{♀ Sb}$). All the female worms obtained were mated, and there was a surplus of unpaired males of both species (♂ Sh , ♂ Sb). The results obtained in this experiment (**Table 6**) show no statistically significant ($p=0.226$) difference in the proportion of homospecific (n=86; 52%) and heterospecific pairs (n=80; 48%). Furthermore the proportion of paired males among *S. bovis* was 70,5% (86 out of 122), whereas that for *S. haematobium* was 53,3% (80 out of 150) showing remaining single male of both sexes.

Table 6. Summarized information of experiment 4 (*S. bovis* female's choice). Number and identification of paired and unpaired worms recovered from each hamster exposed to 150 female cercariae of *S. bovis*, 250 male cercariae of *S. haematobium* and 250 male cercariae of *S. bovis*. In brackets, expected number of couples regarding the total number of worms recovered for each species.

Hamster no.	♂ Sb x ♀ Sb	♂ Sh x ♀ Sb	♂ Sh	♂ Sb
1	15	17	14	4
2	10	25	19	2
3	3	8	13	4
4	9	15	19	8
5	49	15	5	18
TOTAL	86 (74)	80 (92)	70	36

Combined experiments 1-4

In order to have an integrated view of the proportion of homospecific and heterospecific pairing occurring between *S. haematobium* and *S. bovis* we gathered the number of homospecific couples (♂ Sh x ♀ Sh and ♂ Sb x ♀ Sb) and heterospecific couples (♂ Sh x ♀ Sb and ♂ Sb x ♀ Sh) from the 4 experiments without considering the direction of the cross nor the species (Table 7). Thus, no difference was observed in the proportion of homo (n=203; 54%) and hetero (n=173; 46%) specific mating showing their similar probability of occurrence when both species are present in the same host (Table 7).

Table 7. Summarized information of experiments 1, 2, 3 and 4.

Experiment no.	Homospecific couples	Heterospecific couples	♂ Sh	♂ Sb	♀ Sh	♀ Sb
A	55	68			137	65
B	56	22	35	30		
C	6	3			88	68
D	86	80	70	36		
TOTAL	203	173	105	66	225	133

Experiment 5: Full choice

Four types of pairing (♂ Sh x ♀ Sh and ♂ Sb x ♀ Sb) and two being heterospecific (♂ Sh x ♀ Sb and ♂ Sb x ♀ Sh). There was a surplus of unpaired males and females of both species (Table 8). Homospecific pairs (n=65; 68%) were more numerous than heterospecific pairs (n=30; 32%). The *S. bovis* homospecific couples (n=40; 42%) were the most frequent type of

pairing whereas the pairing ♂ **Sb** x ♀ **Sh** was observed in few cases (n=10; 11%). The proportion of paired males among *S. bovis* was of 71,4% (50 out of 70), compared to 46,4% (45 out of 97) for *S. haematobium*. Regarding the females, the proportion of paired females among *S. bovis* was 52,2% (60 out of 115) compared to 31,5% (35 out of 111) for *S. haematobium*. Chi square test showed a statistically significant difference ($X^2=26,38$ with 3 df, i.e. $P<0,001$) among the proportions of couples observed when all hamsters were analysed together.

Table 8. Summarized information of experiment 5 (full choice). Number and identification of paired and unpaired worms recovered from each hamster exposed to 150 male cercariae of *S. haematobium*, 150 male cercariae of *S. bovis*, 150 female cercariae of *S. haematobium*, 150 female cercariae of *S. bovis*. In brackets, expected number of couples regarding the total number of worms recovered of each type.

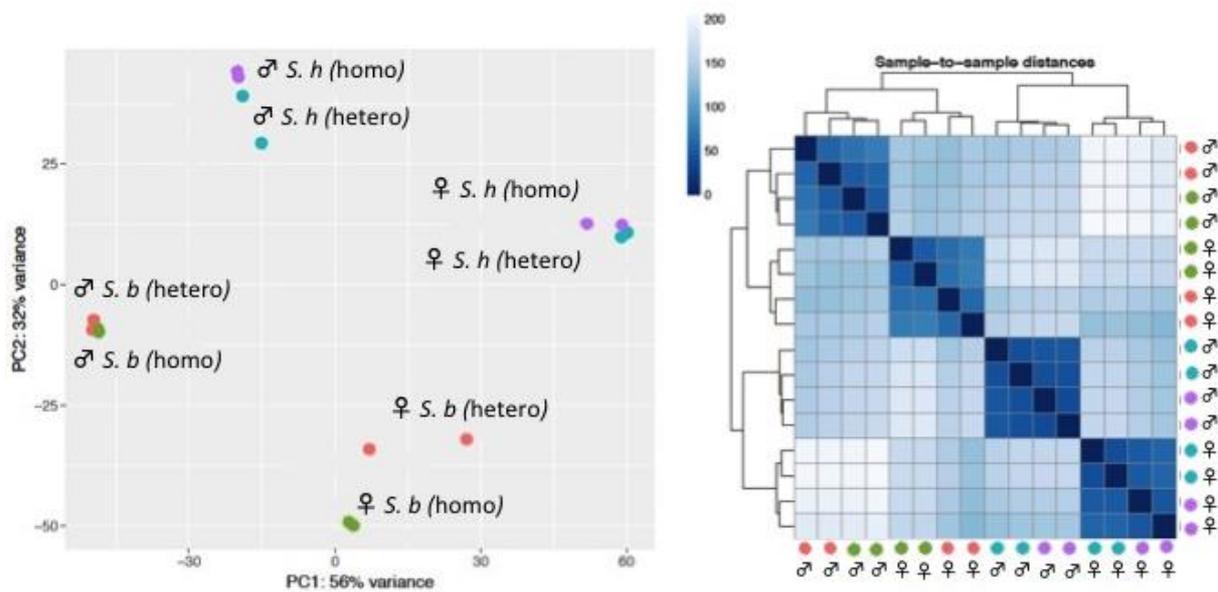
Hamster no.	♂ Sh x ♀ Sh	♂ Sb x ♀ Sb	♂ Sh x ♀ Sb	♂ Sb x ♀ Sh	♂ Sh	♂ Sb	♀ Sh	♀ Sb
1	1	29	5	4	8	5	4	9
2	8	2	5	1	8	3	23	8
3	7	2	1	2	6	5	19	11
4	4	6	3	1	10	4	13	11
5*	5 (6)	1 (1)	6 (1)	2 (6)	20	3	17	16
TOTAL*	25 (27)	40 (20)	20 (28)	10 (20)	52	20	76	55

RNA sequencing of the homo- and heterospecific couples

Data relative to the metrics of the reads following sequencing and *in silico* processing are presented in **Supplementary Table S1**. Each condition composed of two biological replicates were analysed separately for males and females (8 individual samples). Between ~24.7 and ~42.3 million high quality Illumina HiSeq 4000 PE100 RNA-seq reads were obtained after sequencing of the 8 samples. After quality control and adaptor trimming, between ~20.1 and ~34,2 million reads were uniquely mapped on *S. haematobium* reference genome [55] representing between ~77% and ~83% of initial reads (**Supplementary Table S1**).

The *de novo* transcriptome assembly representative of *S. haematobium* and *S. bovis* was composed of 73,171 putative isoform sequences identified as TCONS, and 18,648 unique genes identified as XLOCS. We conserved the longest isoform (TCONS) for each gene (XLOC) for subsequent annotation. The GTF and Fasta file of this transcriptome is available at IHPE website (<http://ihpe.univ-perp.fr/acces-aux-donnees/>). Blast annotations and Gene

Ontology terms of the complete *de novo* assembled transcriptome are available in **Supplementary File S1, Sheet 1**. On the 18,648 genes, 14,414 had at least one hit following Blastx analysis, and 12,332 of them were mapped to at least one GO term using Blast2GO. Quantification of read abundance as well as differential gene expression analysis was performed on the 18,648 genes for each homo- and heterospecific condition (**Supplementary File S1, Sheet 2 and 3-6, respectively**). The heatmap of the sample-to-sample distances as well as the principal component analysis plot are presented in **Figure 2**. A total of 2,312 genes (~12%) were differentially expressed in at least one of the four homo- vs. heterospecific comparisons with a FDR <5% (**Supplementary File S1, Sheet7**). Of these, 2,217 (96%) were annotated using Blastx against the non-redundant database of the NCBI and 1,923 (83%) were mapped to at least one GO term using Blast2GO [59] (**Supplementary File S1 Sheet 7**).



Captions

- *S. bovis* (heterospecific)
- *S. bovis* (homospecific)
- *S. haematobium* (heterospecific)
- *S. haematobium* (homospecific)

Figure 2: Principal component plot of the samples and Heatmap of the sample-to-sample distances.

In *S. haematobium* males, 967 genes were differentially expressed between the homospecific and heterospecific condition (555 under-expressed and 412 over-expressed in homospecific paired males compared to heterospecific ones). The Log₂-Fold changes ranged between -1.13 and 0.65 (**Table 9**). Most of the differentially expressed genes were identified in *S. haematobium* females with 1,255 genes differentially expressed between homo- vs. heterospecific conditions (552 under-expressed and 703 over-expressed in homospecific females). The differential expression of these genes ranged between a log₂ fold change of -1.79 and 0.31 (**Table 9**). Fewer genes were detected as differentially expressed in *S. bovis*. We found 459 and 163 differentially expressed genes between homo- and heterospecific males and females, respectively (371 under- and 88 over-expressed in homospecific males compared to 129 under- and 34 over-expressed in homospecific females). The differential genes expression levels ranged between Log₂ -1.68 and 0.46, and -2.79 and 0.45 for males and females, respectively (**Table 9**). Significantly ($p < 5\%$) up- and down-regulated genes (XLOC) for each comparison as well as their annotation are synthesized in **Supplementary File S1, Sheet 7**. Notice that the log₂ ratios are generally low, meaning that relatively small (but significant) transcriptomic changes occur between homo- and heterospecific paired worms.

Table 9: Total number of differentially expressed genes according to each comparison.

Conditions	Total differentially expressed genes (FDR < 5%) [Log ₂ fold change range]	Under-expressed in homospecific pairing [Log ₂ fold change range] (mean ± SD)	Over-expressed in homospecific pairing [Log ₂ fold change range] (mean ± SD)
Male <i>S. haematobium</i>	967 (5.1%) [-1.13; 0.65]	555 [-0.15; -1.13] (-0.39 ± 0.16)	412 [0.15; 0.65] (0.30 ± 0.08)
Female <i>S. haematobium</i>	1,255 (6,7%) [-1.79; 0.31]	555 [-1.79; -0,30] (-0.50 ± 0,20)	703 [0.31; 1.62] (0.64 ± 0,19)
Male <i>S. bovis</i>	459 (2,4%) [-1.68; 0.46]	371 [-1.68; -0.48] (-0,88 ± 0.23)	88 [0.46; 1.31] (0.59 ± 0.12)
Female <i>S. bovis</i>	163 (0,8%) [-2.79; 0.45]	129 [-2.79; -0.48] (-1.01 ± 0.45)	34 [0.45; 1.26] (0,73 ± 0.18)

Gene Ontology and enrichment analysis of the differentially expressed genes

In order to have a better representation of the functional differences in differential gene expression patterns, over- and under-expressed genes in each condition were separately subjected to enrichment tests towards the complete reference transcriptome using the exact Fisher test on Blast2Go software and concentrating on Biological Process (BP) terms only (**Supplementary File S1 Sheet 8-14**). The top 20 of most significant enriched BP terms identified for each comparison are presented in **Table 10** while the total enriched GO terms are available in **Supplementary File S1, Sheet 8-13** excepted for female *S. bovis* that did not present any enriched BP terms.

Table 10: Top 20 of most significant (FDR) enriched BP terms identified for each comparison

	Enriched GO terms in <i>S. haematobium</i> males	Enriched GO terms in <i>S. haematobium</i> females	Enriched GO terms in male <i>S. bovis</i>
Over expressed genes	<ul style="list-style-type: none"> - Vesicle-mediated transport - Transport - Transmembrane transport - Small GTPase mediated signal transduction - Single-organism transport - Single-organism process - Single-organism localization - Single-organism cellular process - Single organism 	<ul style="list-style-type: none"> - Cell communication - Signal transduction - Single organism signaling - Signaling - Biological regulation - Regulation of biological process - Regulation of cellular process - Response to stimulus - Single-organism process - Cell surface receptor signaling pathway - Cellular response to 	<ul style="list-style-type: none"> - ATP biosynthetic process - Purine ribonucleoside triphosphate metabolic process - ATP synthesis coupled proton transport energy coupled proton transport, down electrochemical gradient - ATP metabolic process - Hydrogen ion transmembrane transport - Purine nucleoside triphosphate metabolic process - Ribonucleoside triphosphate metabolic process

	<p>signaling</p> <ul style="list-style-type: none"> - Signaling - Signal transduction by p53 class mediator - Signal transduction - Response to stimulus - Regulation of small GTPase mediated signal transduction - Regulation of signaling - Regulation of signal transduction - Regulation of molecular function - Regulation of hydrolase activity - Regulation of cellular process - Regulation of cell communication 	<p>stimulus</p> <ul style="list-style-type: none"> - Biological adhesion - Cell adhesion - Regulation of response to stimulus - Developmental process - Metal ion transport - Ion transmembrane transport - Single-organism developmental process - Regulation of signal transduction - Inorganic ion transmembrane transport 	<ul style="list-style-type: none"> - Purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process - Proton transport - Hydrogen transport - Nucleoside triphosphate metabolic process - Purine nucleoside triphosphate biosynthetic process - Ribonucleoside triphosphate biosynthetic process - Purine nucleoside monophosphate metabolic process - Purine ribonucleoside monophosphate metabolic process - Ribonucleoside monophosphate metabolic process - Nucleoside triphosphate biosynthetic process - Nucleoside monophosphate metabolic process - Purine nucleoside metabolic process
--	---	--	--

<p>Under expressed genes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Biological regulation - Single-organism process - Signaling - Regulation of biological process - Single organism signaling - Regulation of cellular process - Cell communication - Signal transduction - Response to stimulus - Cellular response to stimulus - Localization - Intracellular signal transduction - Establishment of localization - Small GTPase mediated signal transduction - Single-organism cellular process - Cell surface receptor signaling pathway - Regulation of response to stimulus - Protein 	<ul style="list-style-type: none"> - Organonitrogen compound biosynthetic process - Organonitrogen compound metabolic process - Translation - Cellular amide metabolic process - Peptide biosynthetic process - Amide biosynthetic process - Peptide metabolic process - Gene expression - Ribosome biogenesis - Cellular protein metabolic process - Ribonucleoprotein complex biogenesis - Protein metabolic process - Cellular component biogenesis - rRNA metabolic process - rRNA processing - Ribosomal large subunit biogenesis - ncRNA processing 	<ul style="list-style-type: none"> - Vesicle-mediated transport - Transport - Transmembrane transport - Small GTPase mediated signal transduction - Single-organism transport - Single-organism process - Single-organism localization - Single-organism cellular process - Single organism signaling - Signaling - Signal transduction by p53 class mediator - Signal transduction - Response to stimulus - Regulation of small GTPase mediated signal transduction - Regulation of signaling - Regulation of signal transduction - Regulation of molecular function - Regulation of hydrolase activity - Regulation of cellular process
-------------------------------------	---	--	--

	phosphorylation - Regulation of catalytic activity - Regulation of biological quality	- Cellular component organization or biogenesis - Ribosome assembly - RNA metabolic process	- Regulation of cell communication
--	---	---	------------------------------------

In *S. haematobium* males, over-expressed genes (in homospecific paired males compared to hererospecific ones) were involved in vesicle-mediated, single organism and transmembrane transport, but also in signalling, signal transduction, cell communication and response to stimulus. In *S. haematobium* males, under-expressed genes (over expressed in heterospecific males) were found also involved in signalling, signal transduction, and establishment of localization, cell communication, response to stimulus, and other cell surface receptor signalling pathways. In *S. haematobium* females, over expressed in homospecific females were similarly found involved in signalling, signal transduction and cell communication, but also cell surface receptor signalling pathway, response to stimulus, biological adhesion and cell adhesion, ion transmembrane transport, but also importantly in developmental process. In *S. haematobium* females, under expressed genes (overexpressed in heterospecific females) were similarly found involved in organonitrogen biosynthetic and metabolic process, amide and peptide biosynthetic process, ribosome and ribonucleoprotein complex biogenesis and assembly, but also rRNA and ncRNA processing, gene expression, translation, and protein metabolic process.

In *S. bovis* males, overexpressed genes (overexpressed in homospecific males) were found involved in ATP biosynthetic and metabolic process, purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic and metabolic process, hydrogen ion transmembrane, and proton transport, that play important roles in signal transduction. Finally in *S. bovis* males, under expressed genes (overexpressed in heteorspecific males) were involved in vesicle-mediated and transmembrane transport, signalling, signal transduction (GTPase mediated, p53 class mediator), and regulation of cell communication, localization and response to stimulus.

While no BP terms were found enriched for *S. bovis* female genes, we found overexpressed genes (overexpressed in homospecific females) with hypothetical functions (XLOC_001576, XLOC_003111, XLOC_003372, XLOC_004850, XLOC_009793, XLOC_010897, XLOC_013855, XLOC_015349, XLOC_015813, XLOC_016157) other were genetic mobile elements (XLOC_002874: TPA_exp: pol poly, XLOC_014741: TPA: endonuclease-reverse transcriptase, XLOC_015522: reverse transcriptase, XLOC_015629: transposase domain-containing, XLOC_018156: Gag-Pol poly, XLOC_018414: TPA: gag-pol poly) or involved in transcription (XLOC_017136: Transcription elongation regulator). Finally, some genes could be related to development, reproduction and growth functions (XLOC_005649: cell division cycle 20 homolog; XLOC_001956: egg C3782, XLOC_007815: craniofacial development 2-like, XLOC_014939: early growth response) signal transduction pathways (XLOC_017979: serine: threonine kinase WNK1) and response to stimulus and stress (XLOC_009339: Universal stress, XLOC_017856: heat shock). Concerning *S. bovis* female under expressed genes (overexpressed in heterospecific females) we found genes involved in protein processing (XLOC_000223: Insulin-degrading enzyme), transport (XLOC_005976: Rab effector) and methylation (XLOC_006465 and XLOC_006665: phosphatase methylesterase 1 (S33 family), XLOC_007644: rhoptry associated membrane antigen, XLOC_005720 multifunctional methyltransferase subunit TRM112), signalling (XLOC_006785: ecsit (evolutionarily conserved signalling intermediate in toll pathways), signal transduction (XLOC_014554: Ras-associating and dilute domain-containing, XLOC_016125: multiple pdz domain, XLOC_013088: mitogen-activated kinase 1), gene expression (XLOC_012360: histone H4-like), but also development (XLOC_012514: craniofacial development 2-like). Interestingly, a fair amount of differentially expressed genes involved in drug and toxin extrusion or transport have been identified in this work (XLOC_000411/ multidrug and toxin extrusion, XLOC_003937, XLOC_005055: Multidrug and toxin extrusion 2, XLOC_006288: Multidrug resistance-associated, XLOC_012449: Ribosomal S6 kinase beta-2, XLOC_014176: Transcription factor jun-B, XLOC_015494: Multidrug resistance 1, XLOC_017204: synaptic vesicular amine transporter-like).

Discussion

Organisms with an obligate sexual reproductive stage, including parasites, may exhibit reproductive isolation mechanisms preventing them from interbreeding. In schistosomes it was originally thought that no mate recognition systems existed and that pairing between species in the definitive host occurred randomly by error or trial [60–62]. More recently, studies have shown that depending of the species interacting, some specific mate recognition could lead to preference of homospecific vs. heterospecific pairing, and that certain species were more competitive than others [28–30,63]. Mate choices may therefore play an important role in conserving the genetic integrity of species infecting the same definitive host.

***S. haematobium* and *S. bovis* mating choices: no pre- and post-zygotic barriers preventing hybridization ?**

In this work we show that the two frequently co-endemic species *S. haematobium* and *S. bovis* readily pair with no preferences for neither homospecific nor heterospecific associations in simultaneous infections, confirming previous observation that there are no physiological barriers preventing reproduction in the same host. The only exception was found in *S. haematobium* male's choice (**Experiment 1**). In this last experiment the proportion of heterospecific couples was significantly higher (**Table 3**) despite *S. haematobium* male's possibility of pairing with single *S. haematobium* females. This observation may reveal *S. haematobium* male's preference for the *S. bovis* females or a higher competence of *S. bovis* females, which may be better at pairing compared to *S. haematobium* females. Interestingly, it has been shown that *S. haematobium* males are better competitors than other species, even if the competitiveness with *S. bovis* has never been tested before. In other mating interaction experiments, it has been evidenced that *S. haematobium* is better at pairing than *S. intercalatum* [28], *S. mattheii* [64] or *S. mansoni* [65]. According to our mating we did not observe significant difference in proportion of homo- nor heterospecific pairs nor in the competitiveness of the *S. haematobium* and *S. bovis* males and females, suggesting that pairing is random. Nevertheless the full choice experiments, consisting in simultaneous infection of both species and both sexes revealed a higher proportion of *S. bovis* homospecific pairs. *S. bovis* homospecific couples doubled it's

expected frequency (40 vs. 20) whereas *S. bovis* male paired with *S. haematobium* female were the rarer pairs formed amongst all others (10 pairs out of 28 expected). This could in part explain why the initial cross between *S. haematobium* females and *S. bovis* males is less frequently encountered in the field [33]. In addition, assessing the number of paired male and female of both species allowed us to reveal that *S. bovis* males and females were more successful at mating than those from *S. haematobium*. This observation differs from previous studies that show a higher competence of *S. haematobium* males compared to *S. mansoni* when mating with females of both species [28,64,65]. Nevertheless it is the first time that mating experiments are performed on this couple of parasites and may underlie the higher competence of *S. bovis*. It was not thus surprising to find random mating occurring between these two species regarding the increasing number of hybrid infection detected for this cross in the field but this may have strong epidemiological consequences. When *S. haematobium* and *S. bovis* have the opportunity to interact (and this may be enhanced but human activities and climate change) they may hybridize and produce a viable and potentially more virulent progeny. Similar results were observed between *S. haematobium* and *S. intercalatum* [61]. or between *S. haematobium* and *S. mansoni* [31] where mating was random between species and where progeny displayed heterosis [10,66–68]. All these observations suggest that hybridization may not be a rare event in nature as previously thought. Also an important requirement for schistosomes to reproduce is their ability to locate each other in the hosts. This may be even more important for heterospecific pairing to occur because the species may be living in different hosts and moreover different host compartments like *S. haematobium* and *S. bovis* (*S. haematobium* lives in the urogenital vessels, *S. bovis* lives in the mesenteric vessels). Thus the most significant reproductive isolating mechanisms between schistosome species is the absence of encounter, caused by geographical distribution or host specificity. This specificity is probably the main mechanism allowing *S. haematobium* and *S. bovis* to conserve their genetic identity (*S. haematobium* being primarily a parasite of man, whereas *S. bovis* is a parasite of domestic stock). The two sister species *S. haematobium* and *S. bovis* have diverged relatively recently compared to other schistosomes, thus the genetic distance between both species is probably not sufficient to avoid successful interbreeding and both species genomes are presumably highly permeable to each other's alleles [69]. The karyotype of species is also important regarding the success of hybridization. Importantly schistosome species have retained the

same karyotype with $n=8$ chromosome pairs including sex chromosomes that are morphologically similar [70]. Moreover because of adaptation of these parasites to different host and because co-infection of both species in the same definitive host is supposed to be rare, no reproductive-isolating mechanisms have evolved to prevent hybridization. This suggests that to produce viable offspring, both species have retained similar processes allowing them to find their partner in the host, pair and reproduce.

Homo- vs. heterospecific pairing: what consequences on the parasites transcriptomes?

Worm pairing in the definitive host is the basal point of sexual reproduction and therefore potentially of hybridization. Studies have clearly established that the presence of the male is necessary not only for the female's growth and sexual development but also for the maintenance of a sexually mature and active state allowing the production of eggs and may not depend upon species-specific pairing [21–23]. Importantly in schistosomes the reproductive process contributes to the disease through egg production. Thus, the molecular changes induced during male-female interactions have been intensively studied for the last 20 years with the objective of stopping or reducing female maturation and egg production. Males through various mechanisms (thigmotactic and chemotactic) transduces a signal to the females, regulating their gene expression and resulting phenotypes [26,71]. It was also demonstrated that female schistosomes also stimulate the males through changes in level of glutathione and lipids, and stimulates tyrosine uptake in the male worms (see [13] for a review). It was also shown that chemical mediators and particularly steroids secreted by adult worms might play an important role in sexual attraction and mating in schistosomes. Thus, male and female schistosomes are strongly interdependent, in terms of behaviour (they have complementary roles in the hosts) but also physiology [11]. Nevertheless, the molecular interplay of interspecific interaction may by itself constitute reproductive isolation mechanisms and needs to be addressed. The interaction of distinct species may fundamentally change the stimulus and the response of each species and sex to the other, consequently modifying the worm gene expression profiles.

In this work we have investigated the consequences of heterospecific pairing between *S. haematobium* and *S. bovis* to identify genes and pathways affected during the very first step towards hybridization. We expected at first to find a strong impact of the heterospecific pairing especially on female transcriptomes compared to males but few differentially

expressed genes and small differences in gene expression were observed in male and females. Indeed the influence of heterospecific pairing on male and female adult worms of both species in terms of number of differentially expressed genes and expression levels (log 2 fold changes) was not striking, suggesting that both species may be highly receptive to each other. This observation is consistent with the precedent mating experiments that suggest random mating between both species. Nevertheless, female *S. haematobium* were the most affected by the pairing status but this might be biased because of more similar biological replicates and subsequent differential gene expression analysis. Another non-exclusive hypothesis could be that *S. haematobium* females are more affected by heterospecific pairing because *S. bovis* males are not as efficient as *S. haematobium* males in inducing their sexual maturation. This could in part explain why the initial cross between *S. haematobium* females and *S. bovis* males is less frequently encountered in the field [33]. In contrary it could reflect a higher reproductive potential of these females that once stimulated by a male of another species undergo a large reprogramming of their transcriptome, allowing them to overcome the potential species-specific incompatibilities. Interestingly some heterologous pairing experiments argue that the differentiation of the gonads of *S. mansoni* females was not achieved to the same extent when using *S. mansoni* males compared to *S. haematobium* or *S. japonicum*. (Reviewed in [27]). In this last situation, species were far more genetically distant compared to the sister species *S. haematobium* and *S. bovis* and could explain the lack of female maturation in that study.

When looking at the genes affected by the pairing status of the worms, striking functions could be linked to male-female interactions as suggested by other studies. We found enrichment for genes linked to Signalling, Cell communication, Signal transduction, Response to stimulus, Protein phosphorylation, Ribosome biogenesis, Gene expression, and Translation suggesting that similarly to non-pairing vs. pairing effect, homospecific vs. heterospecific pairing affects similar pathways in schistosomes. Indeed the first insights into the molecular basis of male and female interaction with a particular interest in the pairing process, proliferation, differentiation and maturation of female gonads have been obtained and seem regulated by signal transduction cascades and particularly signalling pathways such as the TGF-beta and Ras (receptor tyrosine kinase coupled pathway) signalling pathways [71–77]. Amongst other potentially relevant genes, we found the TGF beta signal transducer gene (XLOC_001519) to be over expressed only in *S. haematobium*

heterospecific males compared to homospecific ones. It has been previously demonstrated that the schistosome TGF-beta receptor allows regulating the expression of a gynecophoric canal protein (SmGCP) involved in worm pairing [72]. Interestingly, we have identified two gynecophoral canal protein genes (XLOC_002442 and XLOC_005292) that were over expressed both in homospecific male and female *S. haematobium* but not in *S. bovis*. Its potential role in homospecific vs. heterospecific pairing need to be defined but may allow both species to readily locate and pair. Many genes related to signal transduction and particularly Tyrosine kinase pathways were also detected (XLOC_004577: Tyrosine- kinase Abl, XLOC_005184: tyrosine kinase, XLOC_007209: Tyrosine- kinase transmembrane receptor Ror2, XLOC_007591: Tyrosine- kinase transmembrane receptor Ror, XLOC_009271: Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase, XLOC_011296: tyrosine kinase, XLOC_012657: Dual specificity kinase CLK2, XLOC_015162: Tyrosine- kinase BTK) suggesting its important role in homospecific vs. heterospecific pairing. These signalling networks are often very complex and may result in activating transcription factors regulating male and female-specific genes. Some studies have shown that they are closely involved in male and female parasite interaction following pairing [74]. Other genes related to the Ras (receptor tyrosine kinase coupled pathway) signalling pathway were identified in this work in males *S. haematobium* (XLOC_002464: Ras and EF-hand domain-containing homolog, XLOC_002677; Ras-related GTP-binding A) suggesting the importance of these pathways in worm pairing. Indeed, the Ras pathway is known to regulate cell proliferation events in other organisms, and its role in transducing a signal for mitogenic proliferation in female reproductive development was previously hypothesized [27]. Other kinase receptors [78] have been identified in male and female schistosomes likely to have a role in growth, differentiation, and development. More recent studies focusing on the gonad specific and pairing-dependent transcriptomes of male and female schistosomes have revealed that stem cell-associated and neural functions may be associated with such male-female interaction patterns [14]. Some evidence of involvement of neural processes during the male-female interaction of *S. mansoni* have been shown [79] but other processes such as apoptosis [80] and ribosome biogenesis [81] seem important in regulating schistosomes gonads and sexual maturation after pairing. We found a striking enrichment of genes involved in ribosome biogenesis in *S. haematobium* females heterospecific paired worms compared to homospecific ones (XLOC_000452 40S ribosomal S6, XLOC_000708: 60S

ribosomal L8, XLOC_000778 ribosomal S18, XLOC_000804 Ribosomal L35A, XLOC_001087 ribosomal S16, XLOC_001100; 39S ribosomal mitochondrial, XLOC_002043 phospholipase DDHD1), together with an enrichment of functions linked to gene expression regulation and translation, suggesting that ribosomal genes may regulate the expression and further the translation of proteins important in female sexual maturation. These results may show that both species may have maintained similar patterns of interaction between males and females allowing them to reproduce. The molecular pathways affected by heterospecific pairing seem related to conventional reciprocal male and female interactions. A strong regulation of these genes during pairing with another species may allow stronger coadaptation between species-specific sexes, allowing the parasite to overcome their relatedness and divergence resulting in successful mating. Many other genes potentially involved in the encounter, interaction and communication of the two species genomes have arisen from this work. Further attention is needed to decipher the role of each of them in a hybridization context. Moreover, importantly, genes involved in drug and toxin extrusion or transport have been identified as differentially expressed occurring to the pairing status of the worm. Thus, these results may offer important candidate genes in schistosome drug response and may suggest that co-infection, heterospecific pairing and hybridization may alter drug sensitivity.

Conclusion

Natural hybridization between *S. haematobium* and *S. bovis* is strongly conditioned by their host specificity as shown from these mating experiments. Our data suggest that no mate recognition system mitigate hybridization between these two species. Heterospecific pairing modifies worm transcriptomes of both sexes and particularly for pathways involved in male and female interactions, pairing and reproduction. This suggests that both species are still closely related and may still be well coadapted allowing an efficient reproduction. In case of host specificity breakdown, both species could readily pair and produce viable hybrid offspring. According to the increase number of human patients found infected by such hybrid, this breakdown may have already occurred. Because such hybrids may display heterosis compared to their parental species, it may promote the spread of the disease in unexpected environments. Ultimately, this could reveal new issues in the disease control, and alteration in current chemotherapeutic treatments.

Acknowledgments

We would like to acknowledge G enome Qu ebec and University McGill innovation center as well as Roscoff Bioinformatics platform ABiMS (<http://abims.sb-roscoff.fr>) and NGS facility at the bio-environment platform (University of Perpignan).

Supplementary Table S1: Metrics of the RNA-sequencing reads processing

Samples Nb. and Species or cross information	Nb. Raw reads	Unique mapped reads (RNA-Star)	Multiple mapped reads (RNA-Star)	Counted reads HTseq count)
Homospecific male <i>S. haematobium</i> 1	25,665,693	21,005,702 (81.84%)	1,134,018 (4.42%)	21,005,702
Homospecific male <i>S. haematobium</i> 2	27,150,103	22,258,493 (81.98%)	1,186,760 (4.37%)	22,258,493
Homospecific female <i>S. haematobium</i> 1	42,363,412	34,278,876 (80.92%)	2,171,678 (5.13%)	34,278,876
Homospecific female <i>S. haematobium</i> 2	30,454,409	24,468,041 (80.34%)	1,622,389 (5.33%)	24,468,041
Homospecific male <i>S. bovis</i> 1	26,012,418	21,117,390 (81.18%)	1,224,578 (4.71%)	21,117,390
Homospecific male <i>S. bovis</i> 2	25,121,738	20,219,184 (80.48%)	1,137,615 (4.53%)	20,219,184
Homospecific female <i>S. bovis</i> 1	29,923,046	23,629,560 (78.97%)	1,443,782 (4.82%)	23,629,560
Homospecific female <i>S. bovis</i> 2	32,310,467	25,805,478 (79.87%)	1,728,431 (5.35%)	25,805,478
Heterospecific male <i>S. haematobium</i> 1	31,181,147	25,025,092 (80.26%)	1,477,525 (4.74%)	25,025,092
Heterospecific male <i>S. haematobium</i> 2	41,069,585	33,181,879 (80.79%)	1,965,817 (4.79%)	33,181,879
Heterospecific female <i>S. haematobium</i> 1	32,528,922	27,012,488 (83.04%)	1,495,053 (4.60%)	27,012,488
Heterospecific female <i>S. haematobium</i> 2	26,150,037	21,689,997 (82.94%)	1,192,946 (4.56%)	21,689,997
Heterospecific male <i>S. bovis</i> 1	35,452,508	28,508,522 (80.41%)	1,593,821 (4.50%)	28,508,522
Heterospecific male <i>S. bovis</i> 2	29,653,984	24,134,277 (81.39%)	1,342,181 (4.53%)	24,134,277
Heterospecific female <i>S. bovis</i> 1	28,866,557	23,381,119 (81.00%)	1,476,016 (5.11%)	23,381,119
Heterospecific female <i>S. bovis</i> 2	26,487,124	20,921,068 (78.99%)	1,324,362 (5.00%)	20,921,068

References

1. Barton N, Bengtsson BO. The barrier to genetic exchange between hybridising populations. *Heredity (Edinb)*. 1986;57: 357–376. doi:10.1038/hdy.1986.135
2. Nosil P. *Ecological speciation*. Oxford University Press; 2012.
3. Barnard-Kubow KB, Galloway LF. Variation in reproductive isolation across a species range. *Ecol Evol*. 2017;7: 9347–9357. doi:10.1002/ece3.3400
4. Coyne JA, Orr HA. “Patterns of Speciation in *Drosophila*” Revisited. *Evolution (N Y)*. 1997;51: 295. doi:10.2307/2410984
5. Kirkpatrick M, Ravigne V, Ravigné V, Ravigne V. Speciation by Natural and Sexual Selection : Models and Experiments. *Am Nat*. 2002;159: S22-35. doi:10.1086/338370
6. Windsor DA. Controversies in parasitology, Most of the species on Earth are parasites. *Int J Parasitol*. 1998;28: 1939–1941. doi:https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00153-2
7. Henrich T, Kalbe M. The role of prezygotic isolation mechanisms in the divergence of two parasite species. *BMC Evol Biol*. *BMC Evolutionary Biology*; 2016;16: 1–10. doi:10.1186/s12862-016-0799-5
8. Ramiro RS, Khan SM, Franke-Fayard B, Janse CJ, Obbard DJ, Reece SE. Hybridization and pre-zygotic reproductive barriers in *Plasmodium*. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2015;282. doi:10.1098/rspb.2014.3027
9. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)*. 2014;383: 2253–2264. doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2
10. Léger E, Webster JP. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology*. 2016; 1–16. doi:10.1017/S0031182016001190
11. Loker ES, Brant S V. Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends Parasitol*. 2006;22: 521–528. doi:10.1016/j.pt.2006.09.001
12. Basch PF. Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitol Today*. 1990;6: 160–163. doi:10.1016/0169-4758(90)90339-6
13. Moné H, Boissier J. Sexual biology of schistosomes. *Adv Parasitol*. 2004;57: 89–189. doi:10.1016/S0065-308X(04)57002-1
14. Lu Z, Sessler F, Holroyd N, Hahnel S, Quack T, Berriman M, et al. Schistosome sex matters: A deep view into gonad-specific and pairing-dependent transcriptomes reveals a complex gender interplay. *Sci Rep*. *Nature Publishing Group*; 2016;6: 1–14. doi:10.1038/srep31150
15. Boissier J, Moné H. Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology*. *Cambridge University Press*; 2000;121: 379–383.
16. Beltran S, Boissier J. Male-biased sex ratio: why and what consequences for the genus

- Schistosoma? Trends Parasitol. 2010;26: 63–69. doi:10.1016/j.pt.2009.11.003
17. Beltran S, Boissier J. Schistosome monogamy: who, how, and why? Trends Parasitol. 2008;24: 386–391. doi:10.1016/j.pt.2008.05.009
 18. Beltran S, Boissier J. Are schistosomes socially and genetically monogamous? Parasitol Res. 2009;104: 481–483. doi:10.1007/s00436-008-1225-8
 19. Beltran S, Cézilly F, Boissier J. Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. PLoS One. 2008;3. doi:10.1371/journal.pone.0003328
 20. Jourdane J, Imbert-Establet D, Tchuente LAT. Parthenogenesis in schistosomatidae. Parasitol Today. Elsevier; 1995;11: 427–430.
 21. Popiel I. Male-stimulated female maturation in Schistosoma: A review. J Chem Ecol. 1986;12: 1745–1754. doi:10.1007/BF01022380
 22. Popiel I, Cioli D, Erasmus DA. The morphology and reproductive status of female Schistosoma mansoni following separation from male worms. Int J Parasitol. 1984;14: 183–190. doi:https://doi.org/10.1016/0020-7519(84)90047-X
 23. Clough ER. Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature Schistosoma mansoni females. J Parasitol. United States; 1981;67: 535–539.
 24. Cornford EM, Fitzpatrick AM. The mechanism and rate of glucose transfer from male to female schistosomes. Mol Biochem Parasitol. 1985;17: 131–141. doi:https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90012-X
 25. Loverde PT, Chen L. Schistosome female reproductive development. Parasitol Today. 1991;7: 303–8. doi:10.1016/0169-4758(91)90263-N
 26. LoVerde PT, Niles EG, Osman A, Wu W. Schistosoma mansoni male–female interactions. Can J Zool. 2004;82: 357–374. doi:10.1139/z03-217
 27. Kunz W. Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. Trends Parasitol. 2001;17: 227–231. doi:10.1016/S1471-4922(01)01893-1
 28. Southgate VR, Tchuente LAT, Vercruyse J, Jourdane J. Mating behaviour in mixed infections of Schistosoma haematobium and S. mattheei. Parasitol Res. Springer; 1995;81: 651–656.
 29. Tchuente LAT, Imbert-Establet D, Delay B, Jourdane J. Choice of mate, a reproductive isolating mechanism between Schistosoma intercalatum and S. mansoni in mixed infections. Int J Parasitol. 1993;23: 179–185. doi:10.1016/0020-7519(93)90139-P
 30. Cosgrove CL, Southgate VR. Mating interactions between Schistosoma mansoni and S. margrebowiei. Parasitology. Cambridge University Press; 2002;125: 233–243.
 31. Webster BL, Southgate VR, Tchuente L-A. Mating interactions between Schistosoma haematobium and S. mansoni. J Helminthol. 2007/02/01. Cambridge University Press; 1999;73: 351–356. doi:DOI: 10.1017/S0022149X99000591
 32. Brémond P, Sellin B, Sellin E, Naméoua B, Labbo R, Théron A, et al. Arguments for the

- modification of the genome (introgression) of the human parasite *Schistosoma haematobium* by genes from *S. bovis*, in Niger. *C R Acad Sci III*. 1993;316: 667–670.
33. Huyse T, Webster BL, Geldof S, Stothard JR, Diaw OT, Polman K, et al. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathog*. 2009;5. doi:10.1371/journal.ppat.1000571
 34. Webster BL, Diaw OT, Seye MM, Webster JP, Rollinson D. Introgressive Hybridization of *Schistosoma haematobium* Group Species in Senegal: Species Barrier Break Down between Ruminant and Human Schistosomes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7. doi:10.1371/journal.pntd.0002110
 35. Moné H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsá-Nguéma R, Ibikounlé M, Boissier J, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol Res*. 2015;114: 4127–4133. doi:10.1007/s00436-015-4643-4
 36. Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, Allienne JF, Huyse T, Mas-Coma S, et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16: 971–979. doi:10.1016/S1473-3099(16)00175-4
 37. Ramalli L, Mulero S, Noël H, Chiappini JD, Vincent J, Barré-Cardi H, et al. Persistence of schistosomal transmission linked to the cavu river in southern Corsica since 2013. *Eurosurveillance*. 2018;23: 2–5. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017
 38. Pitchford RJ. A check list of definitive hosts exhibiting evidence of the genus *Schistosoma* weinland, 1858 acquired naturally in Africa and the Middle East. *J Helminthol*. INIST CNRS; 1977;51: 229–251. doi:10.1017/S0022149X00007574
 39. Rollinson D. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. *Biol schistosomes from genes to latrines*. Academic Press; 1987;
 40. Pitchford RJ, Visser PS. The role of naturally infected wild rodents in the epidemiology of schistosomiasis in the Eastern Transvaal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1962;56: 126–135. doi:10.1016/0035-9203(62)90139-6
 41. Catalano S, Sène M, Diouf ND, Fall CB, Borlase A, Léger E, et al. Rodents as Natural Hosts of Zoonotic *Schistosoma* Species and Hybrids: An Epidemiological and Evolutionary Perspective From West Africa. *J Infect Dis*. 2018; jiy029. doi:10.1093/infdis/jiy029
 42. Webster JP, Gower CM, Knowles SCL, Molyneux DH, Fenton A. One health - an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evol Appl*. 2016;9: 313–333. doi:10.1111/eva.12341
 43. Kincaid-Smith J, Boissier J, Allienne JF, Oleaga A, Djuikwo-Teukeng F, Toulza E. A Genome Wide Comparison to Identify Markers to Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 2016;10: e0005138. doi:10.1371/journal.pntd.0005138

44. Boissier J, Rivera ER, Moné H. Altered behavior of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 2003;89: 429–433. doi:10.1645/0022-3395(2003)089[0429:ABOTSB]2.0.CO;2
45. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res.* 2003;91: 144–150. doi:10.1007/s00436-003-0943-1
46. Théron a, Pages JR, Rognon a. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Exp Parasitol.* 1997;85: 1–9. doi:10.1006/expr.1996.4106
47. Beltran S, Galinier R, Allienne JF, Boissier J. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103: 501–503. doi:S0074-02762008000500017 [pii]
48. Van den Broeck F, Geldof S, Polman K, Volckaert FAM, Huyse T. Optimal sample storage and extraction protocols for reliable multilocus genotyping of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Infect Genet Evol. Elsevier B.V.;* 2011;11: 1413–1418. doi:10.1016/j.meegid.2011.05.006
49. Webster BL, Rollinson D, Stothard JR, Huyse T. Rapid diagnostic multiplex PCR (RD-PCR) to discriminate *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*. *J Helminthol.* 2010;84: 107–114. doi:10.1017/S0022149X09990447
50. Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, et al. Galaxy: A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res.* 2005;15: 1451–1455. doi:10.1101/gr.4086505
51. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Afgan E, Ananda G, Baker D, et al. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 2010;11. doi:10.1186/gb-2010-11-8-r86
52. Blankenberg D, Gordon A, Von Kuster G, Coraor N, Taylor J, Nekrutenko A, et al. Manipulation of FASTQ data with galaxy. *Bioinformatics.* 2010;26: 1783–1785. doi:10.1093/bioinformatics/btq281
53. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011;17: 10. doi:10.14806/ej.17.1.200
54. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29: 15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
55. Young ND, Jex AR, Li B, Liu S, Yang L, Xiong Z, et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat Genet.* 2012;44: 221–225. doi:10.1038/ng.1065
56. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, et al.

- Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group; 2010;28: 511. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1621>
57. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015;31: 166–169. doi:10.1093/bioinformatics/btu638
 58. Love MI, Anders S, Huber W. Differential analysis of count data - the DESeq2 package [Internet]. *Genome Biology.* 2014. doi:110.1186/s13059-014-0550-8
 59. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics.* Oxford University Press; 2005;21: 3674–3676.
 60. Armstrong JC. Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *J Parasitol.* JSTOR; 1965; 605–616.
 61. Southgate VR, Rollinson D, Ross GC, Knowles RJ. Mating behaviour in mixed infections of *Schistosoma haematobium* and *S. intercalatum*. *J Nat Hist.* Taylor & Francis; 1982;16: 491–496. doi:10.1080/00222938200770391
 62. Rollinson D, Southgate VR, Vercruyse J, Moore PJ. Observations on natural and experimental interactions between *Schistosoma bovis* and *S. curassoni* from West Africa. *Acta Trop.* 1990;47: 101–114. doi:10.1016/0001-706X(90)90072-8
 63. Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Combes C, Jourdane J. Mating behaviour in schistosomes: Are paired worms always faithful? *Parasitology Today.* 1996. pp. 231–236. doi:10.1016/0169-4758(96)10020-X
 64. Webster BL, Southgate VR. Mating interactions of *Schistosoma haematobium* and *S. intercalatum* with their hybrid offspring. *Parasitology.* Cambridge University Press; 2003;126: 327–338.
 65. Webster BL, Southgate VR, Tchuente LAT. Mating interactions between *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni*. *J Helminthol.* Cambridge University Press; 1999;73: 351–356.
 66. Webster BL, Southgate VR. Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology.* 2003;127: 231–242. doi:10.1017/S0031182003003597
 67. Wright CA, Ross GC. Hybrids between *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei* and their identification by isoelectric focusing of enzymes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74: 326–332. doi:10.1016/0035-9203(80)90091-7
 68. Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Jourdane J, Kaukas A, Vercruyse J. Hybridisation between the digeneans *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei*: Viability of hybrids and their development in sheep. *Syst Parasitol.* 1997;36: 123–131. doi:10.1023/A:1005705030619
 69. Kincaid-Smith J, Tracey A, de Carvalho Augusto R, Bulla I, Holroyd N, Rognon A, et al.

- Whole genome sequencing and morphological analysis of the human-infecting schistosome emerging in Europe reveals a complex admixture between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory; 2018; doi:10.1101/387969
70. Grossman a I, Short RB, Cain GD. Karyotype evolution and sex chromosome differentiation in Schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae). *Chromosoma*. 1981;84: 413–30. doi:10.1007/BF00286030
 71. LoVerde PT, Andrade LF, Oliveira G. Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12: 422–428. doi:10.1016/j.mib.2009.06.005
 72. Osman A, Niles EG, Verjovski-Almeida S, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni* TGF- β receptor II: Role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathog*. 2006;2: 0536–0550. doi:10.1371/journal.ppat.0020054
 73. LoVerde PT, Osman A, Hinck A. *Schistosoma mansoni*: TGF- β signaling pathways. *Exp Parasitol*. 2007;117: 304–317. doi:10.1016/j.exppara.2007.06.002
 74. Knobloch J, Beckmann S, Burmeister C, Quack T, Grevelding CG. Tyrosine kinase and cooperative TGF β signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol*. 2007;117: 318–336. doi:10.1016/j.exppara.2007.04.006
 75. Beckmann S, Quack T, Burmeister C, Buro C, Long T, Dissous C, et al. *Schistosoma mansoni*: Signal transduction processes during the development of the reproductive organs. *Parasitology*. 2010;137: 497–520. doi:10.1017/S0031182010000053
 76. Freitas TC, Jung E, Pearce EJ. TGF- β signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog*. 2007;3: 489–497. doi:10.1371/journal.ppat.0030052
 77. Andrade LF de, Mourão M de M, Geraldo JA, Coelho FS, Silva LL, Neves RH, et al. Regulation of *Schistosoma mansoni* Development and Reproduction by the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8: e2949. doi:10.1371/journal.pntd.0002949
 78. Dissous C, Morel M, Vanderstraete M. Venus kinase receptors: Prospects in signaling and biological functions of these invertebrate kinases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5: 1–8. doi:10.3389/fendo.2014.00072
 79. Leutner S, Oliveira KC, Rotter B, Beckmann S, Buro C, Hahnel S, et al. Combinatory Microarray and SuperSAGE Analyses Identify Pairing-Dependently Transcribed Genes in *Schistosoma mansoni* Males, Including Follistatin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7. doi:10.1371/journal.pntd.0002532
 80. Galanti SE, Huang SCC, Pearce EJ. Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6. doi:10.1371/journal.pntd.0001509

Chapitre 3 : Caractéristiques des espèces parentales, modification des traits d'histoire de vie et phénotypage des lignées hybrides

1) Modification des traits d'histoire de vie des hybrides de première génération et bases transcriptomiques des changements phénotypiques

- **Publication :** Julien Kincaid-Smith, Cristian Chaparro, Jean-Francois Allienne, Jérôme Boissier and Eve Toulza. Reciprocal first generation *S. haematobium* x *S. bovis* hybrids display heterosis compared to parental species: from life history trait modifications to differentially expressed genes

Note à l'attention des lecteurs : il s'agit ici d'une version préliminaire du manuscrit qui demandera un travail de rédaction plus approfondi avant soumission.

Les hybrides peuvent présenter une valeur adaptative supérieure par rapport à leurs parents, un phénomène appelé vigueur hybride ou hétérosis. Pour les schistosomes ce phénomène peut avoir de graves conséquences sur la dynamique de transmission et le contrôle de la maladie, notamment en augmentant leur prévalence, leur intensité et/ou leur spectre d'hôtes. Dans la première partie de ce chapitre nous présentons les premières étapes dans l'élaboration d'un protocole d'évolution expérimentale visant à générer des lignées de parasites hybrides. Nous avons analysé les modifications de traits d'histoire de vie d'hybrides miroirs de première génération (F1 et F1') par rapport aux espèces parentales et ceci uniquement au sein de l'hôte définitif vertébré (hamster). Finalement, suite au séquençage transcriptomique (RNA-seq) de ces parasites adultes nous avons analysé les modifications d'expression génique induites par l'hybridation afin d'identifier des mécanismes moléculaires à la base changements phénotypiques observés. Ce travail a permis de mettre en évidence que les hybrides *S. haematobium* x *S. bovis* présentent une vigueur hybride chez l'hôte expérimental vertébré. Ils ont un potentiel infectieux plus important que les espèces parentales et ceci s'accompagne d'une pathologie et morbidité accrues chez les hamsters. Au niveau moléculaire une reprogrammation importante du

transcriptome des hybrides est observée avec de nombreux gènes différentiellement exprimés comparés aux parents. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme, le système immunitaire, le développement, la croissance et la reproduction. Au vu des caractéristiques phénotypiques observées, les schistosomes hybrides pourraient être à l'origine d'une augmentation de la prévalence et de l'intensité de la maladie dans les zones où ces hybrides sont présents.

Reciprocal first generation *S. haematobium* x *S. bovis* hybrids display heterosis compared to parental species: from life history trait modifications to differentially expressed genes

Julien Kincaid-Smith¹, Cristian Chaparro, Jean-Francois Allienne, Jérôme Boissier¹ and Eve Toulza^{1*}

* Corresponding author

¹ Univ. Perpignan Via Domitia,. IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France.

Abstract

Hybridization in the genus *Schistosoma* is potentially of severe health importance. One frequently diagnosed hybrid in humans, also responsible of a large-scale outbreak in Europe, is a hybrid swarm between *S. haematobium* and *S. bovis*, the human urogenital and cattle intestinal agents of the disease, respectively. The resulting offspring may outperform their parents; a phenomenon termed heterosis or hybrid vigour and may have acquired adaptive traits increasing their transmission and invasive capacity. In order to assess if such hybrids may be an emerging global threat, we explored the consequences of hybridization both on the parasite life history traits, and their transcriptomes. We started performing reciprocal crosses to produce first generation hybrids between both species and analysed the life history trait modifications regarding their interactions with the experimental golden hamster definitive host. Transcriptomes of parental species and hybrid worms of each sex were using RNA-sequencing to identify global patterns and biological processes affected during hybridization. This work revealed that *S. haematobium* x *S. bovis* hybrids display heterosis, and that the phenotypes of these hybrids may be responsible for an increased pathology and morbidity in the vertebrate hosts. A large reprogramming of the transcriptome was observed with genes involved in the metabolism, immune system, development, growth and reproduction of the hybrids. Because hybrid schistosomes may be more prevalent and virulent, likely increasing the prevalence and intensity of the disease in areas where hybridization occurs, health authorities need to implement adequate procedures allowing sustainable disease control and avoid hybrid schistosomiasis spread in unanticipated unexpected environments.

Introduction

Schistosomiasis is a neglected tropical disease caused by parasitic flatworms of the genus *Schistosoma* (Trematoda: Digenea). This disease is a major burden in tropical and sub-tropical areas. The majority of cases are reported in Africa, where poverty and poor sanitation increase the prevalence and intensity [1,2]. With over 230 million people infected worldwide, and more than 200,000 human deaths each year this disease is of great medical importance and a priority for the World Health Organisation [1,3]. Many wild and domestic animals are also impacted by *Schistosoma* parasites, with an estimate of 165 million infected animals [4] which is probably still underestimated. Schistosomes have a complex life cycle including two obligatory hosts, one mollusc intermediate host for which the parasite species is very specific, and one vertebrate definitive host that can be less specific depending on parasite species and in which sexual reproduction takes place. After pairing in the definitive host, females produce hundreds of eggs daily that need to gain a fresh-water environment to hatch. Eggs that are not caught in the host tissues will be voided through the urine or faeces of the vertebrate host and liberate a larvae (miracidia) actively searching for its specific mollusc intermediate host. After penetration the miracidia transform into sporocysts that produce by asexual multiplications thousands of cercariae. When released, these last larvae will actively search for a definitive host in which they will penetrate through the skin and develop in a few weeks into sexually mature male or female adult worms.

Schistosome species are often co-endemic and therefore co-infections in the definitive host is possible allowing different species to interact, sometimes resulting in hybridization. Hybridization in the genus *Schistosoma* has been suspected for a long time based on observation of intermediate egg morphotypes, and has been confirmed through mating experiments and thanks to the development of molecular tools (see [5] for a review). Since the last few years it has become an important subject of research for the scientific and health communities and is extensively investigated in the field. The reasons for such interest is due to i) the growing evidence that hybrid schistosome infections are frequent in endemic areas especially West Africa where hybrids are highly prevalent [5–13] but also because ii) hybridization has recently been linked to the emergence of schistosomiasis in Europe where transmission is persisting since 2013 [5–15] and last because iii) heterosis (*i.e.* the

outperformance of parental species by the hybrids) is suspected to play a role in the parasite transmission, potentially increasing its prevalence and invasive capacities. Because schistosomiasis has been a major burden for human health since decades it is essential to clarify the importance of hybridization and heterosis in order for health authorities to implement new strategies to achieve and maintain suitable disease control.

The recent and recurrent schistosomiasis outbreak in Europe involved a hybrid swarm between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis*, [10,12] two major schistosome species, mostly infecting humans and cattle, respectively. The potential consequences of hybridization may be important for disease transmission and emergence in Europe. Hybridization has usually been shown to affect prevalence, intensity, and host spectrum of the parasites. Indeed hybrid schistosome crosses between different species (*S. haematobium* x *S. intercalatum*, *S. haematobium* x *S. guineensis*, *S. haematobium* x *S. mattheei*) exhibit a greater infectivity, increased *cercariae* longevity, a faster development into adults and an increased growth rate of the worms, but also have a higher reproductive potential compared to their parental species alone [5,16–19], which could increase the hybrid parasites invasive capacities like observed in Cameroon [20]. Importantly, hybrid schistosomes including animal infecting species are also predicted to be able to break down host specificity, thus raising the risk of new zoonotic hybrid parasites and animal reservoirs, which has severe consequences for the control of the disease [11,21]. Therefore, hybridization in the genus *Schistosoma* could be associated with increased prevalence in hybrid zones, but may also be responsible for outbreaks in unexpected areas like in it has been the case in Corsica.

Despite the observations of many life history phenotypic changes in schistosomes, neither the consequences of hybridization nor the underlying molecular mechanisms of heterosis have been investigated. They remain puzzling for geneticists and evolutionary biologist, but usually heterosis is a phenomenon brought by increased genetic diversity resulting in a higher fitness [22]. Depending on the genomic introgression levels of the individuals and the parts of the genome concerned the life history traits modification may vary if it affects non-coding regions or areas of the genome influencing virulence, or other relevant traits for the parasite transmission.

To explore the consequences of hybridization in schistosomes we performed experimental crosses to produce reciprocal first generation hybrids between *S. haematobium* and *S. bovis* that both share half of the genome of their parents but differ according to their maternal or paternal inherited alleles. In this work we focused on the life history traits relative to the parasite interaction with the golden hamster experimental definitive host as the adult worm stage and the eggs they produce in this host are responsible for the pathology. We measured the infective capacities and the virulence of these hybrid parasites compared to the pure parental species by studying i) the *cercariae* infectivity, ii) the induced pathology in the definitive hamster host, iii) the adult parasite prolificacy, and iii) the egg morphology and size. This last trait is particularly important since egg morphology is the main diagnosis tool used to assess the species at the origin of the infection but also causes the pathology. In order to have insights into some molecular features involved in life history traits modification, we sequenced and compared the transcriptomes of the reciprocal hybrids and the pure parental species using RNA-sequencing. We analysed differential gene expression, and show that a very high number of genes are affected by hybridization.

Material and methods

Ethics approval

Housing, feeding and animal care, including experiments on animals were carried out according to the national ethical standards established in the writ of 1 February 2013 (NOR: AGRG1238753A) setting the conditions for approval, planning and operation of establishments, breeders and suppliers of animals used for scientific purposes and controls. The Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations (DDSCPP) provided the permit N°C66-136-01 to our laboratory for experiments on animals. The investigator possesses the official certificate for animal experimentation (Decree n° 87–848 du 19 octobre 1987; number of the authorization 007083).

Parasite parental species and reciprocal experimental crosses

S. haematobium was recovered from infected patients (with ethical clearance) in the South East part of Cameroon (Barombi Kotto lake (4°28'04"N. 9°15'02"W), together with its sympatric *Bulinus truncatus* snail host, and has been maintaining in the IHPE laboratory on Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). We have sequenced NADH. COI and ITS genes

from 35 worms recovered from infected hamsters. All the sequences were referenced as *S. haematobium* sequences (no sequence similar to other schistosome species were found). *S. bovis* was recovered from the Spanish laboratory of parasitology of the Institute of Natural Resources and Agrobiological Sciences in Salamanca, and maintained in the laboratory with both *Bulinus truncatus* and *Planorbium metidjensis* sympatric intermediate hosts and on *Mesocricetus auratus* definitive host [23]. Starting with experimental crosses, we created a full-sibling consanguine line of *S. haematobium* because of its high genetic diversity compared to the *S. bovis* isolate maintained in laboratory for over 47 years. To do so we crossed a single male genotype with a single female genotype using molecular sex markers [24]. Briefly, molluscs were infected with a single *miracidium* of *S. haematobium*, allowing the development of clonal male or female genotypes. After sexing of the *cercariae* emitted from individual molluscs, we infected hamsters with 300 *cercariae* of clonal populations of each sex by surface application method for 1h. After sexual reproduction of the adult worms in the hamsters, the resulting offspring eggs were hatched, used to infect molluscs and subsequently hamsters, and this full-sibling consanguine line was used for subsequent experiments. Methods employed for mollusc and rodent infections and parasite collection were described previously [25–27].

For the pure parental species we first started by infecting six hamsters with homospecific combinations of 600 *cercariae* (300 *cercariae* of each sex) of *S. haematobium*, or *S. bovis* in order to compare life history trait modifications with the hybrids. The experimental procedure was the same for both parents (**Figure 1**). A pool of *miracidiae* obtained from homospecific crosses was used to infect molluscs (5 *miracidiae* for each mollusc infection). Thirty-five days after exposing the molluscs to the parasites, pools of 600 *cercariae* from infected molluscs were used to infect hamsters. Three months after infection hamsters were euthanatized, and adult worms were recovered from portal perfusion, while eggs were recovered from the hamsters' liver.

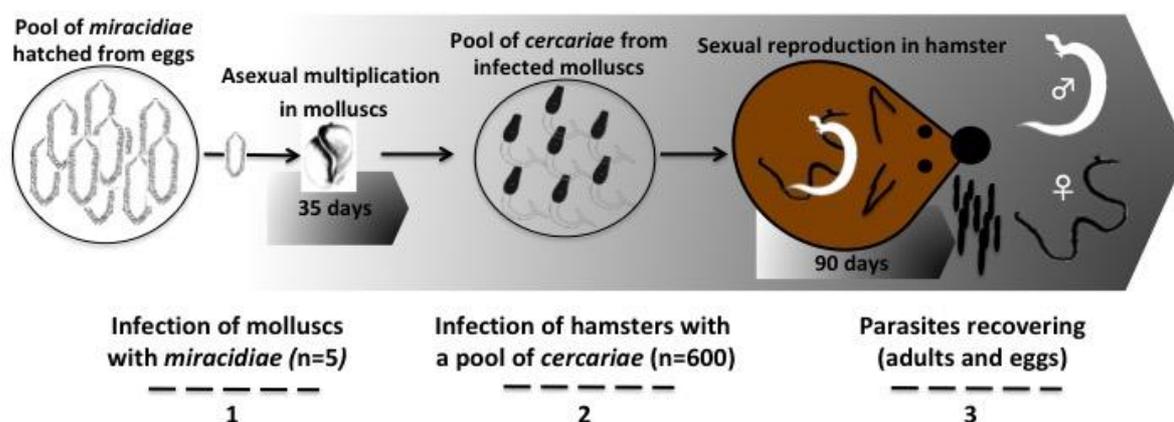
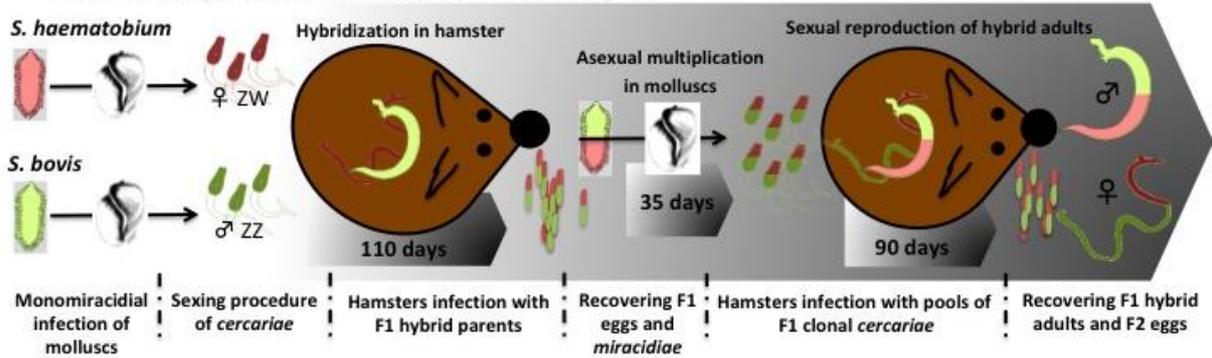


Figure 2: Experimental infections to recover parental species eggs and adult worms

Using the full-sib consanguine line, laboratory *S. haematobium* x *S. bovis* hybrids were produced by exposing molluscs to a single *miracidium* of either parasite species and using the resulting single sex pools of *cercariae* of each species we infected hamsters with mixed combinations of parasites in equal proportions (**Figure 2**). The pure *S. haematobium* and pure *S. bovis* were used to produce reciprocal F1 ($\text{♀ } S. haematobium \times \text{♂ } S. bovis$) and F1' ($\text{♀ } S. bovis \times \text{♂ } S. haematobium$) hybrids. Batches of six hamsters per combinations were infected using 300 female *S. haematobium* and 300 male *S. bovis cercariae* (F1 cross; n=6) or 300 male *S. haematobium* and 300 female *S. bovis cercariae* (F1' cross; n=6). One hundred and ten days after infection, hamsters containing the parents (heterospecific couples) and hybrid egg progenies were euthanized (**Figure 2**).

In order to recover first generation reciprocal hybrids F1 and F1' adults and evaluate life history traits changes as well as their molecular basis, hybrid eggs were hatched and hybrid *miracidiae* were used to infect *Bulinus truncatus* snails (n=5 *miracidiae* per molluscs). After the prepatent phase (~35 days) the F1 and F1' *cercariae* were used to infect hamsters (n = 7 hamsters for each cross) with pools of 600 *cercariae* of unknown sex, and F1 and F1' adult worms were collected from portal perfusion at 90 days after infection (**Figure 2**). All hamsters were subjected to the same life history traits assessment under the same experimental procedures and conditions.

- Cross 1 = F1 (♀ *S. haematobium* x ♂ *S. bovis*)



- Cross 2 = F1' (♀ *S. bovis* x ♂ *S. haematobium*)

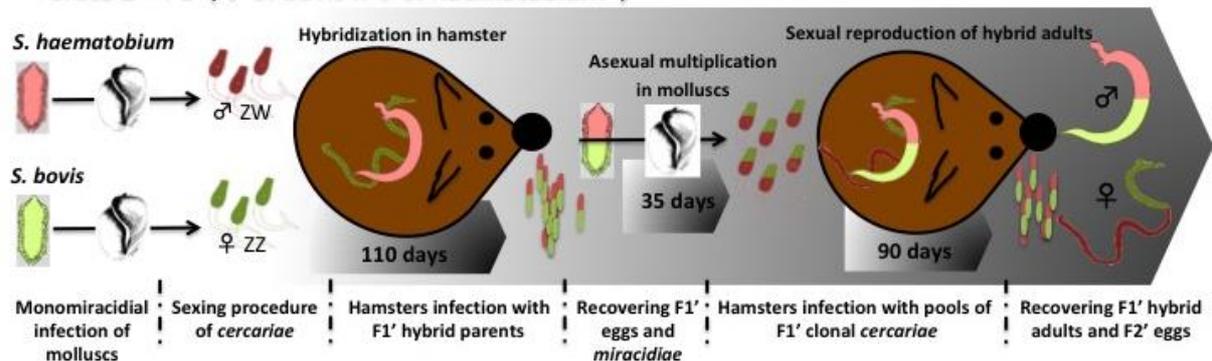


Figure 2: Experimental infections to produce *S. haematobium* x *S. bovis* reciprocal first generation hybrids

1) Life history traits analysis of parental vs. hybrid parasites

In this work healthy female hamsters were used as control (n=6). At perfusion dates, hamsters were weighted. After hepatic portal perfusion, we measured the *cercariae* infectivity by counting the number of adult worms recovered on the total number of *cercariae* (n=600) used for infestation. The adult sex ratio was defined as the percentage of males among the total number of worms and assessed by counting to proportion of adults of each sex thanks to pronounced sexual dimorphism of the worms. Organs including the spleen and liver were recovered and weighted using a precision balance. The induced pathology (hepato-splenomegaly) has been assessed by measuring the ratio between the spleen or liver of the hamsters and their total body weight. Then two parts of the livers of each hamster were gathered and used as technical replicates to assess the female prolificacy (i.e.. the number of eggs produced by mature females). The two liver samples were weighted and put in 5ml of 5% potassium hydroxide (KOH) for 1h30 at 45°C and at room temperature overnight. Thereafter, eggs in solution were re-suspended by bubbling air through the tube, and counted in 50 µl of the solution (at least two technical replicates)

using a dissecting light microscope. The remaining eggs were used to assess the eggs morphology of the two parental and hybrid lines. We focused on parental species eggs (homospecific cross), but also the ones produced from the heterospecific cross (F1 and F1' parents), and eggs produced by the F1 and F1' adults (eggs containing the F2 and F2' *miracidiae*). Eggs were put on glass slides and analysed using a light microscope with objective lens magnification of x10 or x25. We measured the length (including the spine), width at its larger point, spine size, and total area of the eggs (based on the outline of the eggs). Pictures were taken on a Wild Heerbrugg M400 ZOOM Makroskop (Leica. Germany) or Dialux20 (Leitz. Germany) coupled to Nikon digital sight DS – Fi1 digital camera. Measurements were produced using the open-source imaging program ImageJ version 1.51 (Abràmoff, Magalhães, and Ram 2004; Prodanov and Verstreke 2012). For measurements on ImageJ we converted a known distance (100 µm) under the microscope to its relative size in pixels (507 pixel = 100 µm).

2) Statistical analysis

Life history traits analyses were compared either using Kruskal-Wallis H Test followed by pairwise comparisons tests (Dunn tests) for the *cercariae* infectivity, the induced pathology, and the prolificacy whereas One-Way ANOVA followed with Scheffe Post Hoc tests was used for egg morphology comparison using SPSS v20.0 and considered significant with a *P-value* threshold of 5%.

3) RNA extraction and transcriptome sequencing procedure

S. bovis and *S. haematobium* male and female paired adult worms from homospecific infections, as well as F1 and F1' paired adult male and female hybrids were isolated after portal perfusion and carefully separated (avoiding any contamination from the other sex) in pools of 10-12 individuals per condition and sex in three biological replicates representing a total of 24 samples. These samples were directly flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Total RNA extractions were performed using the TRIzol™ Thermo Fisher Scientific protocol (ref: 15596018) slightly modified as each reagents volume was halved. Briefly, pools of frozen adult worms in 2ml microtubes were grounded with two steel balls using Retsch MM400 cryobrush (2 pulses at 300Hz for 15s). After extraction following manufacturer's protocol, total RNA was eluted in 44 µl of ultrapure water. DNase treatment

was then performed using ThermoFisher Scientific Turbo DNA-free kit TM (ref: AM1907). RNA was then purified using the Qiagen RNeasy mini kit (ref: 74104) using manufacturer's protocol and eluted in 42 µl of ultrapure water. Quality and concentration were assessed by spectrophotometry with the Agilent 2100 Bioanalyzer system and using the Agilent RNA 6000 nano kit (ref 5067-1511). Further details are available at [Environmental and Evolutionary Epigenetics Webpage. <http://methdb.univ-perp.fr/epievo/>]. cDNA library construction and sequencing were performed by the Génome Québec platform. The TruSeq stranded mRNA library construction kit (Illumina Inc., USA) was used following the manufacturer's protocol on 300 ng of total RNA per sample. Sequencing of the 24 samples was performed in 2x100 bp paired-end on a Illumina HiSeq 4000. Sequencing data are available at the NCBI-SRA under the BioProject accession number PRJNA491632

Transcriptome analysis of the pure and hybrid parasites

Read processing and *in silico* analysis were performed on Galaxy web platform [30,31] implemented on the local server of the IHPE laboratory. The quality of the raw reads produced after sequencing was checked using FASTX-toolkit (Hannon laboratory—FASTX-Toolkit. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) integrated into our Galaxy platform [32] and sequencing adaptor were trimmed using Cutadapt program Galaxy Version 1.16.1 [33]. Because all reads had a mean Phred quality score above 32, neither trimming, nor filtering was performed.

De novo* transcriptome assembly and generation of a common reference between *S. haematobium* and *S. bovis

Because parental species may share common genes, and because the hybrids are composed of alleles from both species, a single reference was needed to infer differential gene expression between parents and hybrids. Mapping the reads on a unique species-specific transcriptome would not allow us to identify differentially expressed genes specific to the other species. Thus both *S. haematobium* and *S. bovis* transcriptomes were reconstructed separately without a reference genome using all male and female RNA-seq reads for each pure parental species with Trinity assembler [34]. The minimum contig size was set to 500 bp, Contigs potentially representing multiple transcript isoforms of a single gene were merged into a single sequence using SuperTranscripts [35]. The resulting Fasta and Gtf files

produced were then used to produce a supertranscriptome representative of both *S. haematobium* and *S. bovis* set of genes. To merge potentially common genes between the two species, we performed a Reciprocal Blast Hit (RBH) of *S. haematobium* and *S. bovis* Supertranscripts by MegaBlastn using a threshold of 70% similarity. Output files were first filtered on the length (at least 50% of the query represented by the subject) and we conserved only reciprocal hits resulting in a supertranscriptome of 77.427 contigs. These genes were considered as common between *S. haematobium* and *S. bovis*, while all other genes were considered as specific to a species. We kept all genes representative of both species in the supertranscriptome, with their “common” or “specific” annotation in the GTF and Fasta files.

Differential gene expression (DGE) analysis

Reads of the 24 sequenced samples were mapped as individual datasets using RNA-star Galaxy Version 2.6.0b-1 [36] to the supertranscriptome. The number of reads mapped to each gene was counted using HTseq-count Galaxy Version 0.9.1 setting “union” as overlap resolution mode [37]. Finally, we evaluated the differential gene expression levels with DESeq2 Galaxy Version 2.11.40.2 [38]. We carried out 12 comparisons with *S. haematobium* vs. *S. bovis*; *S. haematobium* vs. F1; *S. haematobium* vs. F1'; *S. bovis* vs. F1; *S. bovis* vs. F1', and F1 vs. F1', for each sex separately, in order to assess the differential gene expression patterns of the pure parental species compared to the hybrid lines. Differential gene expression results were filtered on the adjusted *P*-value (Benjamini-Hochberg multiple testing based False Discovery Rate) and considered significant when $\leq 1\%$. Because one replicate of the F1 male condition was aberrant in the clustering, we performed the DGE analysis by excluding this sample.

Functional annotation

The *de novo* assembled supertranscriptome was entirely annotated using Blastx searches against the NR non-redundant protein database of the NCBI. The XML output file was used for gene ontology (GO) mapping and annotation using Blast2Go version 4.1.9 [39]. Finally enrichment Fisher's exact tests were performed on up- or down-regulated set of genes focusing on biological process (BP) ontology terms after GOSlim subset reduction to have a

more global classification. The *P*-value for significance was set to 1% False Discovery Rate (FDR).

Results

Life history trait analysis

Hetero-specific pairings allowed us to reciprocally produce F1 (♀ *S. haematobium* x ♂ *S. bovis*) and F1' (♀ *S. bovis* x ♂ *S. haematobium*) progenies and compared them to their parents (homo-specific *S. haematobium* or *S. bovis* pairings). For the hybrid lines, not all hamsters survived until the day of perfusion (90 days). Two hamsters died prematurely for each F1 and F1' line, hampering the life history traits analysis. In addition, two moribund hamster had to be perfused prematurely at days 67 and 81 after infestation, for F1 and F1' respectively, to prevent premature death and furthermore reducing sample size.

- *Cercariae* infectivity, number of couples and sex ratio

The mean number of adult worms recovered represented 19% and 21% of the total *cercariae* used for infestation for *S. bovis* and *S. haematobium* respectively, and 38% and 30% for F1 and F1' hybrid lines respectively (**Table 1**). The *cercariae* infectivity did not show any significant differences (KW= 3.52; *p* = 0.318) between lines because of high variability in number of worms recovered and small number of hamsters remaining alive in the hybrid crosses. Nevertheless, these results suggest that hybrids may have an increased potential to infect and develop into their host, sometimes even causing premature death.

The number of couples was correlated to the total number of worms recovered (Pearson 0.924; *p* = 0.0001), but did not show any significant differences between the conditions (KW = 1.029; *p* = 0.794) neither did the sex ratio (KW = 4.708; *p* = 0.195). Data for individual hamsters are presented in **Supplementary Table S1**.

Table 1: Results of the life history traits modification analysis.

Parameters	<i>S. bovis</i> n=6	<i>S. haematobium</i> n=6	F1 n=5	F1' n=5	Healthy hamsters n=6
<i>Cercariae</i> infectivity	111 ± 40 SD (19%)	129 ± 17 SD (21%)	207 ± 195 SD (38%)	162 ± 63 SD (30%)	-
Number of couples	52 ± 20 SD	46 ± 11 SD	81 ± 75	70 ± 34 SD	-
Sex-ratio (males/females)	0.99 ± 0.21 SD	0.74 ± 0.43 SD	1.15 ± 0.46 SD	1.46 ± 0.78 SD	-
Number of eggs per female	2,291 ± 467 SD	1,249 ± 659 SD	6,442 ± 7,602	1,013 ± 491 SD	-
Number of eggs per day	2.084 ± 1081 SD	936 ± 453 SD	4,194 ± 2090 SD	1,038 ± 259 SD	-
Number of eggs per day per female	38 ± 8 SD	21 ± 11 SD	110 ± 124 SD	17 ± 8 SD	-
Splenomegaly	0.0024 ± 0.0006 SD	0.0016 ± 0.0003 SD	0.0041 ± 0.0006 SD	0.0041 ± 0.0028 SD	0.0011 ± 0.0001 SD
Hepatomegaly	0.044 ± 0.002 SD	0.044 ± 0.0052	0.047± 0.007 SD	0.051± 0.010 SD	0.038 ± 0.003 SD

- Egg production and female prolificacy

The number of eggs trapped in infected hamster livers as well as female prolificacy was then analysed (Table 1). The mean number of eggs produced per day, and the number of eggs produced per day and per female were assessed considering that females start laying eggs around 30 days after infestations (between 30 and 37 days for *S. bovis*). The mean number of eggs in liver samples showed small variations between replicates. The mean number of eggs per female was significantly different depending on the infestation condition (KW=11.672; $p = 0.009$). A significant difference was observed between F1' and *S. bovis* ($p=0.05$) and between F1 and F1' ($p = 0.05$). The mean number of eggs per day was significantly different (KW = 12.764; $p = 0.005$), between *S. haematobium* and F1 ($p=0.008$) and between F1 and F1' ($p = 0.044$). At last the mean number of eggs per day per female referred to as the female prolificacy was also significantly different according to the infestations (KW = 13.213; $p = 0.004$). Females showed a higher prolificacy in F1 compared to F1' ($p = 0.024$), and compared to *S. haematobium* ($p = 0.048$).

- Induced pathology to the experimental vertebrate host

In this section we used a batch of 6 healthy hamsters for comparison with infected ones. We analysed the induced pathology in hamsters after 90 days of infection through hepatosplenomegalia (**Table 1**). An over-growth of the liver and the spleen is due to the accumulation of eggs and the massive production of white blood cells to fight the infection, respectively. The body, spleen and liver weight were measured. The overgrowth (increase in weight) of the spleen (splenomegalia) was significantly different between conditions (KW = 22.342; $p < 0.0001$). The differences between healthy hamster and F1 ($p = 0.002$) and F1' hybrids ($p < 0.001$) were significant. According to the overgrowth of the liver, difference in hepatomegalia was observed (KW = 9.995; $p = 0.041$), and occur between healthy hamsters and F1' hybrids ($p = 0.037$). Only hamsters infected by hybrids displayed a significant induced pathology.

- Egg morphology

Egg morphologies are shown in **Figures 3-5** and results of the measurements are presented in **Table 2**. Parental species show contrasted phenotypes in terms of egg morphology. As *S. bovis* eggs have a typical spindle shape with a terminal spine (**Figure 3**) *S. haematobium* eggs are elliptical, also with a terminal spine (**Figure 4**).

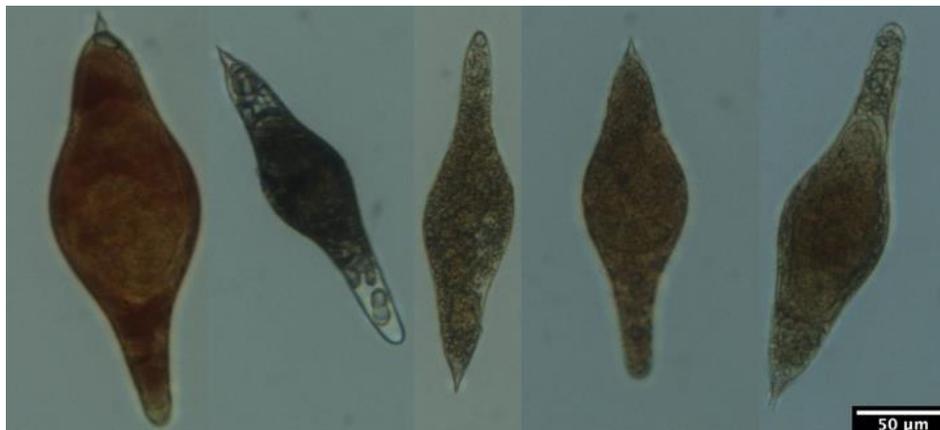


Figure 3: Photographs of *S. bovis* eggs using light microscopy with objective lens magnification of x10 (Scale bar: 50 μ m). Notice that *S. bovis* eggs have a typical spindle shape with a terminal spine

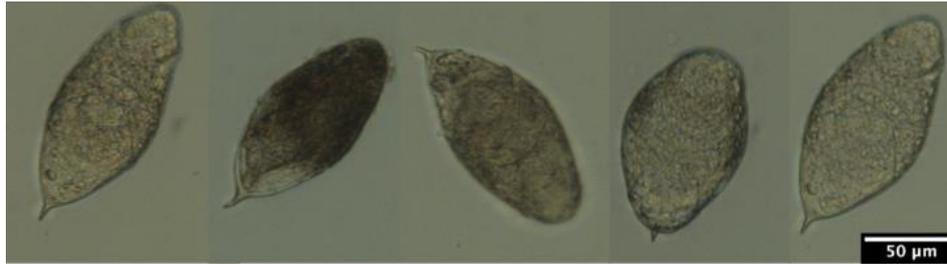


Figure 4: Photograph of *S. haematobium* eggs using light microscopy with objective lens magnification of x10 (Scale bar: 50μm). Notice that *S. haematobium* eggs have a typical elliptical shape with a terminal spine

Interestingly, F1 hybrid eggs produced by ♀ *S. haematobium* crossed with ♂ *S. bovis* have a typical *S. haematobium* egg shape (**Supplementary Figure S1**), while F1' eggs (♀ *S. bovis* x ♂ *S. haematobium*) have a typical *S. bovis* egg shape (**Supplementary Figure S2**). This indicates that egg morphology corresponded to that of the maternal species producing the eggs shell. After hybridization the F1 and F1' adults produced eggs (containing F2 and F2' embryos) that exhibit great polymorphism with a range of shapes through those of the parental species but with most eggs being intermediate in shape and in size (**Figure 5, Table 2**).

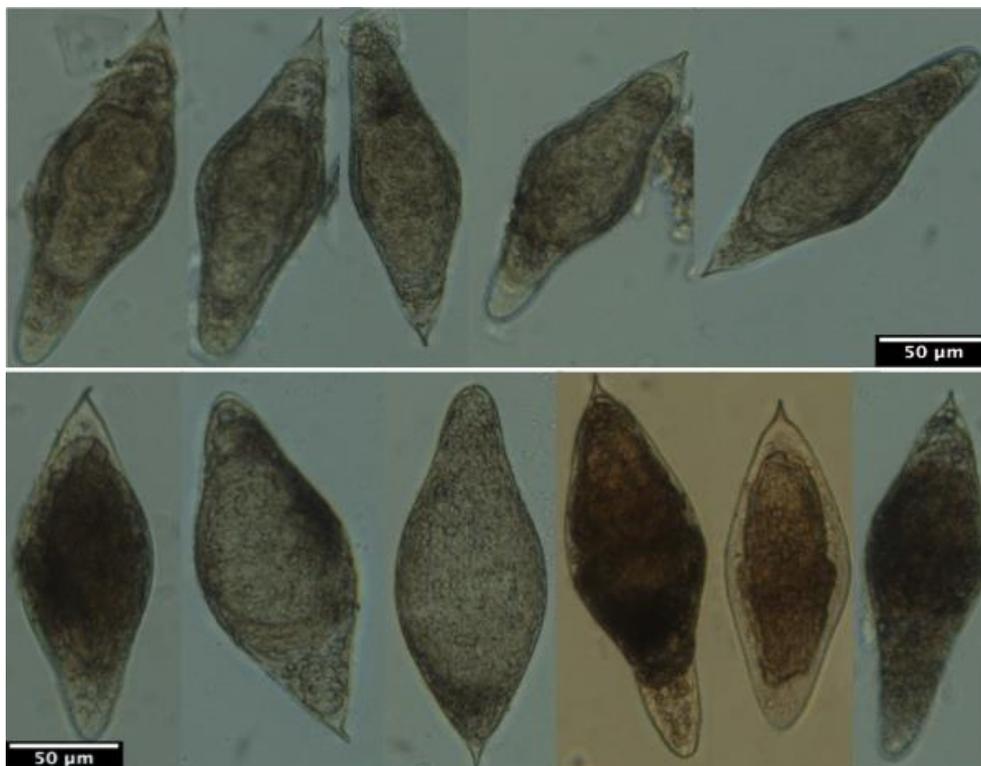


Figure 5: Photographs of F2 (top) and F2' (bottom) eggs using light microscopy with objective lens magnification of x10 (Scale bar: 50μm). Notice that egg shapes are non-typical and seem intermediate to *S. haematobium* and *S. bovis* parental species.

Thereafter at least 30 eggs of each parental species (produced by *S. haematobium* or *S. bovis* adults) and F2/F2' hybrid lines (produced by F1 or F1' adults) were used for morphological measurements. We measured the length (including the spine), width at its larger point, the size of the spin when visible, and the total surface area (**Table 2**). Are also indicated the egg measurements of the heterospecific couples (F1 and F1' parents). From these combinations, the parents are pure, and the hybrid offspring (embryos inside the eggs) are either produced by a female *S. haematobium* crossed with a male *S. bovis* (♀ *S. haematobium* x ♂ *S. bovis*), or a females *S. bovis* crossed with a male *S. haematobium* (♀ *S. bovis* x ♂ *S. haematobium*).

Table 2 : Measurements of parental species, heterospecific couples and the resulting first generation F1 and F1' hybrid eggs. Means have been performed on at least 30 eggs. Range in size is also presented [min-max].

	Mean length (μm) [min-max]	Mean width (μm) [min-max]	Spine (μm) [min-max]	Total area (μm) [min- max]
<i>S. bovis</i> n=33	189.7 \pm 15.6 [160.6-227.4]	52.3 \pm 8.8 [39.5-81.9]	12.3 \pm 3.8 [3.5-19.7]	5453.0 \pm 1256.7 [4053.6 -9745.9]
<i>S. haematobium</i> n=36	129.4 \pm 15.7 [90.9-158.5]	61.5 \pm 7.8 [40.9-75.2]	9.2 \pm 3.4 [1.8-15.8]	5384.2 \pm 1029.9 [3076.4-7696.6]
F1 parents (♀ <i>Sh</i> x ♂ <i>Sb</i>) n=30	142.5 \pm 19.8 [111.2-202.6]	70.4 \pm 11.7 [53.8-106.0]	8.6 \pm 2.2 [4.0-14.1]	7044.9 \pm 2162.4 [4787.4-14451.8]
F1' parents (♀ <i>Sb</i> x ♂ <i>Sh</i>) n=31	193.9 \pm 16.1 [153.1-223.8]	62.7 \pm 9.4 [44.7-82.8]	12.6 \pm 2.7 [6.7-17.8]	6467.9 \pm 1229.8 [4360.2-9446.8]
F1 n=34	171.9 \pm 19.1 [133.0-210.2]	55.2 \pm 10.8 [34.5-77.8]	10.9 \pm 1.6 [7.3-13.7]	5568.2 \pm 1497.4 [3321.0-8382.2]
F1' n=32	160.71 \pm 10.3 [132.9-184.1]	56.3 \pm 7.4 [39.2-72.9]	9.3 \pm 1.3 [6.2-12.4]	5494.0 \pm 980.6 [3174.0-8134.4]

- Egg length and width

The egg length ($F = 80.265$; $p < 0.0001$) and width ($F = 15.018$; $p < 0.0001$) were significantly different according to species and crosses. *S. haematobium* eggs were significantly smaller ($p = 0.0001$), but wider ($p = 0.007$) than *S. bovis*. F1 egg (produced by a female *S. haematobium* paired with a *S. bovis* male) were similar in length to *S. haematobium* ($p = 0.07$) but they were larger ($p = 0.012$). In contrary, F1 eggs were shorter ($p = 0.0001$) but larger than *S. bovis* eggs ($p = 0.0001$). F1' eggs (produced by a female *S. bovis* paired with a *S. haematobium* male) were longer ($p = 0.0001$) but similar in width to *S. haematobium*, whereas they were similar to *S. bovis* length ($p = 0.960$) but larger ($p = 0.002$). Interestingly these patterns revealed an increase in length or in width compared to their maternal species (**Table 2**). Finally F1 and F1' eggs were intermediate in length and width between *S. haematobium* and *S. bovis*. F1 adult eggs were longer than *S. haematobium* ($p = 0.0001$), but shorter ($p = 0.002$) than *S. bovis*. Again, F1' adults eggs were longer than *S. haematobium* ($p = 0.0001$), but were shorter ($p = 0.0001$) than *S. bovis*. No significant differences were observed in terms of width.

- Egg spine length

Concerning the spine length of the eggs, significant differences were observed depending on the species and crosses of origin ($F = 12.499$ $p < 0.0001$). *S. haematobium* egg spines were shorter than *S. bovis* ($p = 0.001$). F1 egg spines length were similar to that of *S. haematobium* but smaller than *S. bovis* ($p < 0.0001$), whereas F1' spine length was similar to *S. bovis* but longer than *S. haematobium* ($p < 0.0001$). This suggests being another maternally transmitted trait. No differences in spine size were observed between F1 adult eggs and parental species whereas F1' adults egg spine length was similar to that of *S. haematobium* but shorter than *S. bovis* ($p = 0.004$).

- Egg area

The total egg area was also measured and showed significant differences ($F = 7.431$: $p < 0.0001$). Comparing *S. haematobium* and *S. bovis* egg area did not revealed any significant differences while they were smaller than F1 parents ($p = 0.001$ and $p = 0.001$. respectively), no significant difference were then observed between parentals species and F1 nor F1'. Nevertheless, F1 and F1' eggs area were different to F1 parents ($p = 0.005$ and $p = 0.006$. respectively).

RNA sequencing, *de novo* transcriptome assembly and consensus reference between *S. haematobium* and *S. bovis*

The summary of the RNA-sequencing data is presented in **Supplementary Table S2**. Between ~24.7 and ~42.3 million of high quality reads were obtained after sequencing of the 24 samples. Using Trinity assembler, we obtained a first *de novo* assembly of 102,209 and 99,285 contigs with a mean length of 1,938 bp (min = 501; max = 21,982) and 1,808 bp (min = 501; max = 20,050) for *S. haematobium*, and *S. bovis* respectively. Using Supertranscripts (Davidson, Hawkins, and Oshlack 2017), we reduced the assembly to 39,390 unique genes for *S. haematobium* and 38,037 unique genes for *S. bovis* with an average length of 1,696 bp (min = 501; max = 24,635) and 1,641 bp (min = 501; max = 22,327). *S. haematobium* and *S. bovis* newly assembled genes were merged in a unique transcriptome of 77,427 contigs. The GTF file and Fasta file of this transcriptome is available at IHPE website (<http://ihpe.univ-perp.fr/acces-aux-donnees/>). Among these sequences we defined 9,821 genes as common between both species, and 29,569, and 28,216 genes were defined as specific for *S. haematobium* and *S. bovis* respectively according to our RBH procedure.

Read mapping and differential gene expression analysis.

Between ~71% and ~74% reads mapped uniquely to 77,125 contigs of the supertranscriptome (**Supplementary Table S2**). On the 77,427 contigs, 40,007 were annotated and 32,656 of them were mapped to at least one GO term using Blast2GO. Blast annotations and gene ontology terms of the supertranscriptome are available in **Supplementary File S1, Sheet 1**. Raw counts from the HTseq analysis as well as the DGE results for each sample and comparisons are presented in **Supplementary File 1 Sheet 2 and 3-14**, respectively and a synthesis of the differentially expressed genes ($p < 1\%$) for each comparison with their annotation is available in **Supplementary File 1 Sheet 15**. The heatmap of the sample-to-sample distances as well as the principal component analysis plot are presented in **Figure 6**. Biological replicates of each condition cluster together and males and females were well separated.

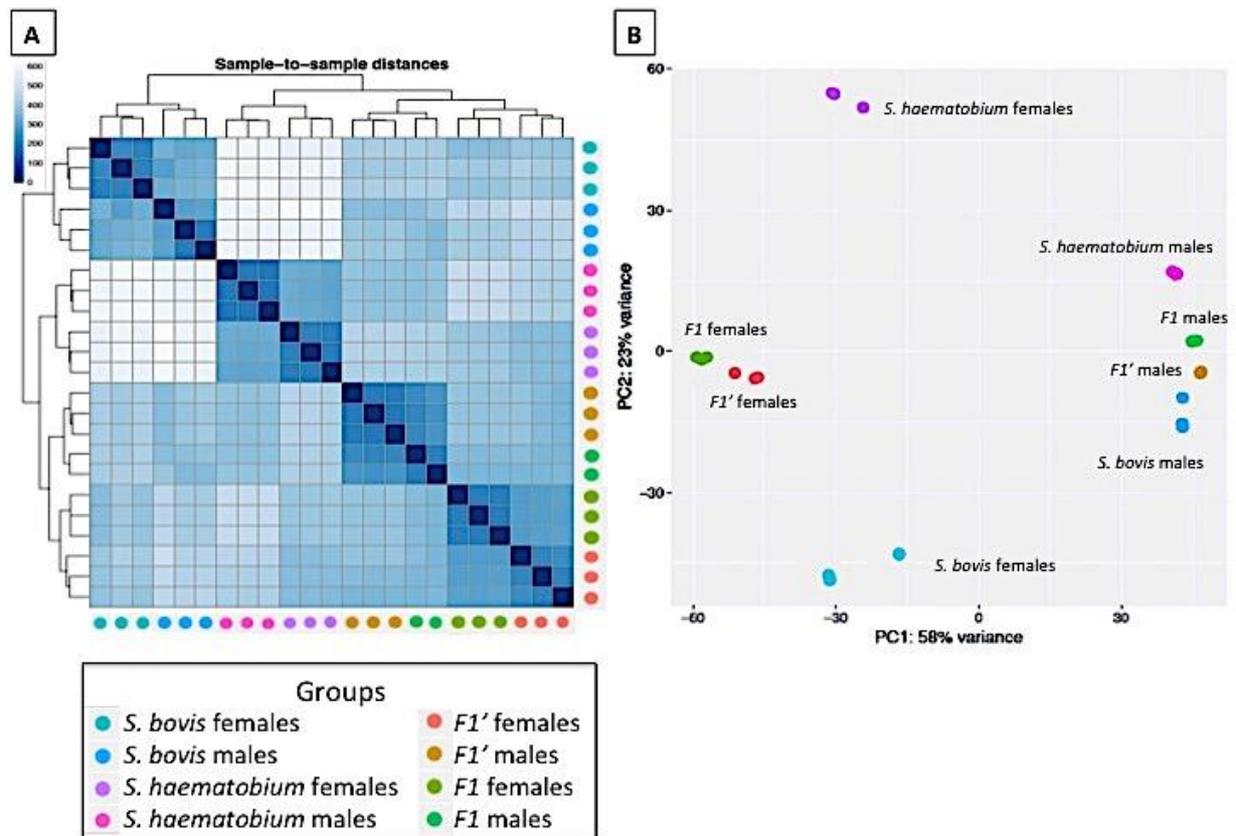


Figure 6: Heatmap of the sample-to-sample distances (A) and Principal component plot of the samples (B).

Results for males and females were treated separately because of potential sex-specific differential gene expression patterns. Nevertheless we also determined the number of differentially expressed genes found in common between both sexes with the same pattern (**Table 3**).

In the *de novo* supertranscriptome of 77,427 putative genes, 44,387 (57%) were differentially expressed in at least one of the 12 comparisons (adjusted *P-value* < 1%). This represented 36,740 differentially expressed genes in at least one condition in males, and 37,837 in females. Most genes were found differentially expressed between *S. haematobium* and *S. bovis* males (32,911) and females (35,542), respectively while the fewer differentially expressed genes were detected when comparing the reciprocal F1 and F1' hybrids (**Table 3**).

Table 3: Total number of differentially expressed genes in our comparative approach.

Comparison		Nb. of differentially expressed genes		
		Males	Females	Common between sexes
<i>S. haematobium</i> vs. <i>S. bovis</i>	Total:	32 911	35, 542	26,776
	Up:	16,717	15,983	12,719
	Down:	16,194	19,559	13,997
<i>S. haematobium</i> vs. F1	Total:	16, 267	20, 141	12,854
	Up:	3,045	6,973	2,168
	Down:	13,222	13,168	10,600
<i>S. haematobium</i> vs. F1'	Total:	23, 524	16, 178	12,910
	Up:	7,808	4,658	3,194
	Down:	15,716	11,520	9,601
<i>S. bovis</i> vs. F1	Total:	10, 877	18, 445	7,906
	Up:	1,789	6,926	992
	Down:	9,088	11,519	6,786
<i>S. bovis</i> vs. F1'	Total:	19, 572	18,609	11,765
	Up:	7,162	6,083	2,805
	Down:	12,410	12,526	8,858
F1 vs. F1'	Total:	1,867	4, 967	420
	Up:	955	2,636	185
	Down:	912	2,331	145

Thereafter we separated up and down regulated genes for Fisher exact enrichment test on Blast2GO (FDR < 1%). Many enriched terms were found, and taking all conditions together, differentially represented GO terms for “Biological Process” were Biological adhesion (GO:0022610), Biological regulation (GO:0065007), Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840), Cellular process (GO: 0009987), Developmental process (GO:0032502), Growth (GO: 0040007), Immune system process (GO:0002376), Localization (GO:0051179), Locomotion (GO: 0040011), Metabolic process (GO:0008152), Multicellular organismal process (GO:0032501), Reproduction (GO:0000003), Response to stimulus (GO:0050896), Signalling (GO:0023052), Single organism process (GO:0044699). These GO terms were found enriched across most of the comparisons. The most general biological process GO terms and their enrichment in up or down regulated genes are presented in **Table 4**. Detailed information of the GO terms and pathways involved in these Biological processes for each comparison is available in **Supplementary File S2 Sheet 1-24**.

Table 4: Enriched « biological process » GO terms found across each comparison and sex. Overrepresented GO terms are overrepresented in the first condition vs. the second, while underrepresented GO terms genes are underrepresented in the first condition vs. the second.

	Overrepresented GO terms	Common between up and down regulated genes enriched Go terms	Underrepresented GO terms
<i>S. haematobium vs. S. bovis</i>			
Males	Immune system process; Locomotion	Biological adhesion; Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Localization; Metabolic process; Multicellular organismal process; Reproduction; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	Growth
Females	-	Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Localization; Metabolic process; Response to stimulus; Reproduction; Signalling; Single organism process	Multicellular organismal process
<i>S. haematobium vs. F1</i>			
Males	-	Biological adhesion; Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Growth; Immune system process; Localization; Locomotion; Metabolic process; Multicellular organismal process; Reproduction; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	-
Females	Biological adhesion	Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Growth; Localization; Metabolic process; Multicellular organismal process; Reproduction; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	Locomotion; Immune system process

<i>S. haematobium vs. F1'</i>			
Males	-	Biological regulation; Biological adhesion; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Growth; Immune system process; Localization; Locomotion: Metabolic process; Multicellular organismal process; Reproduction; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	-
Females	Biological adhesion; Immune system process	Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Localization; Metabolic process; Multicellular organismal process; Reproduction; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	Growth
<i>S. bovis vs. F1</i>			
Males	-	Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Localization; Metabolic process; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	Biological adhesion; Growth; Immune system process; Locomotion; Multicellular organismal process; Reproduction
Females	Biological adhesion; Growth; Immune system process; Locomotion	Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Localization; Locomotion; Metabolic process; Multicellular organismal process; Reproduction; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	-
<i>S. bovis vs. F1'</i>			
Males	Growth	Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Localization; Metabolic process;	Biological adhesion; Reproduction

		Multicellular organismal process; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	
Females	Biological adhesion; Growth; Immune system process; Locomotion	Biological regulation; Cellular component organization of biogenesis; Cellular process; Developmental process; Localization; Metabolic process Multicellular organismal process; Reproduction; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	-
F1 vs. F1'			
Males		Cellular process; Metabolic process	Biological regulation; Biological adhesion; Cellular component organization or biogenesis; Developmental process. Localization; Response to stimulus; Signalling; Single organism process
Females	-	Biological regulation; Cellular component organization or biogenesis; Cellular process; Developmental process; Localization; Metabolic process; Response to stimulus; Signalling; Single organism process	Growth; Immune system process; Locomotion; Multicellular organismal process; Reproduction

In most conditions many of the identified enriched GO terms were affected both in up and down regulated gene lists suggesting an important reprogramming of many primary cellular and metabolic processes. Also, significant “Biological processes” terms relevant for the comparison between hybrids and parental species have been identified as enriched. Most transcriptomic modifications can be observed in developmental process, reproduction, growth, and multicellular organismal process but also interestingly in response to stimulus such as response to stress. Furthermore, genetic mobile elements and transposable elements have been identified as differentially expressed between parental species and

hybrids. Amongst them we identified the Mariner Mos1 transposase (Sh-TRINITY_DN9962_c0_g1_specific), RNA-directed DNA polymerase from transposon X-element (Sh-TRINITY_DN8722_c0_g1_Common), Retrovirus-related Pol poly from type-1 retrotransposable element R2 (Sh-TRINITY_DN4839_c0_g2_specific), TPA: transposase (Sh-TRINITY_DN16419_c0_g1_specific), Transposon Tf2-6 poly (Sh-TRINITY_DN15409_c1_g1_specific), Transposon Ty3-I Gag-Pol poly (Sb-TRINITY_DN17588_c3_g1_specific), Retrotransposon-derived PEG10 (Sb-TRINITY_DN16436_c4_g2_specific), RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey-like (Sb-TRINITY_DN13473_c1_g4_specific). The “genomic shock” allowing such transposon activation [40] may lead new expression pattern in the hybrids as suggest from other studies [41]. The genes underlying these functions that are differentially expressed between parental species and hybrids represent important candidates for schistosome hybrid vigour.

Discussion

Interspecific interactions between schistosomes infecting the same definitive host may occur leading either to parthenogenesis [42] or hybridization and the production of viable and fertile offspring. Hybrids have been identified in the field and studied experimentally, and may be frequent in endemic countries especially in West Africa [6,10,43]. Recently a large-scale outbreak involving hybrids swarm between *S. haematobium* and *S. bovis*, occurred in Europe (Corsica. France) underlying the potential increased invasive capacity of such hybrids [12]. We have recently demonstrated at the whole genome level the high permeability of the European infecting schistosome to foreign species alleles, with over 23% of the Corsican hybrid genome composed of *S. bovis* sequences and 77% of *S. haematobium* sequences [44]. The effects of these combinations of species-specific alleles on the parasite phenotype are unknown but may cause heterosis as shown for other schistosome interspecific interactions [5,16–19]. In this context we have addressed the consequences of hybridization between *S. haematobium* and *S. bovis* in terms of life history trait modification, as well as molecular features potentially involved in these phenotypic changes.

Life history trait analysis: phenotypic characterization of the hybrid lines compared to parental species suggests increased infectivity and morbidity in hamsters

S. haematobium and *S. bovis* are two schistosomes of the haematobium clade [45], but have evolved as separate lineages in different hosts and strongly differ in terms of life history traits. *S. haematobium* infects humans and cause urogenital schistosomiasis whereas *S. bovis* infects cattle and cause intestinal schistosomiasis. The infective capacities of these parasites towards common definitive hosts may differ because of the coevolution between these species and their natural preferred host. The capacity of the larvae infective stage (*cercariae*) to infect and develop into the definitive host is an important aspect of the parasite's invasive capacity and may be strongly determinant for the host-induced pathology. Our experimental infections show that the first generation reciprocal hybrids were more efficient in their capacity to infect and develop in *Mesocricetus auratus* hamsters compared to the parental species. Indeed, the proportion of *cercariae* potentially contributing to the reproductive success of the parasites was enhanced in first generation hybrids and particularly for the F1 cross (**Table 1**). Infectivity rose from 19% and 21% for *S. bovis* and *S. haematobium*, respectively to 38% for F1 hybrids, and 30% for F1' hybrids. Unfortunately our results were not statistically significant because of the low number of hamsters tested, and the high variability amongst them in this work, but suggest the potential higher infection rates of these hybrids. Previous experimental studies have shown that hybrids between *S. haematobium* and *S. intercalatum* [46,47] and between *S. haematobium* and *S. mattheei* [18,19] have acquired enhanced *cercariae* infectivity towards the laboratory hosts. For *S. haematobium* x *S. intercalatum* crosses, 66% of the hybrid *cercariae* were able to develop into adults compared to 30% and 23% for the pure *S. haematobium* and *S. intercalatum* parasites, respectively [16]. In our experiments the increased capacity of the hybrids to infect and develop into the experimental host was accompanied by an increased morbidity in hamsters. Two of the 7 infected hamsters died prematurely for each first generation cross without the possibility for us to assess the number of adult worms present at that time. Two hamsters also had to be perfused prematurely because of the high virulence of the hybrids, strongly reducing our sampling size effort. Nevertheless, these interesting results suggest that these hybrids are more virulent and induce a strong pathology with increased morbidity towards the vertebrate

host. This may have important impact on human health in areas where hybrids are prevalent.

Eggs are primarily responsible for the disease because some get retained in the host tissues (roughly 50%), accumulate and may cause severe damages and immune reactions. Obviously, if more worms are found in hosts the resultant egg load that accumulate in the tissues will be enhanced. Moreover, Schistosome hybrids may also gain an increased reproductive potential (female prolificacy) accentuating the host induced pathology. The results based on the egg load in the liver of the hamsters showed that first generation F1 cross (110 ± 124 eggs per day per female) outperforms the parental species (38 ± 8 eggs for *S. bovis* and 21 ± 11 eggs for *S. haematobium*) but also the reciprocal F1' cross (17 ± 8 eggs per day per females). A high variability was also observed for female prolificacy and the F1 cross significantly outperformed F1' and *S. haematobium* but not *S. bovis*. It was surprising to find such an asymmetry between the reciprocal hybrids but may be related to mitonuclear incompatibilities [48]. The reproductive potential of hybrid schistosomes has already been show to be increased [46,47]. These prolificacy results may also have interesting epidemiological consequences. First, the parasite F1' line may have a low intrinsic prolificacy which could explain why this cross is much less frequently found in the field [6]. Second, it can also be the result of an increased performance of the eggs to reach the external environment, or alternatively of an accumulation of eggs in ectopic tissues because of modifications in the parasite tropism inside the host. Therefore estimation of the prolificacy based uniquely on the liver may have its limitations and may not reflect accurately the female prolificacy. Supporting the last hypothesis, we observed that many eggs were situated in the intestine mucosa of the host for this cross and may result in unusual pathological features. *S. haematobium* is a species of the urogenital vessels while *S. bovis* is a species of the mesenteric veins. Male schistosomes usually transport the females to the egg shedding sites, but the tropism of the hybrids is not known and may depend on the introgression levels of the parasites.

We then measured the parasites host-induced pathology by analysing the overgrowth of the liver (hepatomegaly) and the spleen (splenomegaly) due to the accumulation of eggs and the massive production of white blood cells to fight the infection, respectively. Usually, splenomegaly is proportional to the number of worms in the infected host, and the

hepatomegaly is due to high prolificacy of these worms. Concordant with the higher hybrid infectivity we found that splenomegaly only occurred in the hybrid cross compared to healthy hamsters but not in parental species infections (**Table 1**). Also, hepatomegaly was observed for one hybrid cross (F1') whereas our results suggest that F1' hybrids have a low prolificacy. This enhanced immune reaction may be the result of a particular egg morphotype. Nevertheless, even if it was not statistically significant, infected hamsters always displayed a slight overgrowth of the liver or the spleen compared to healthy ones (**Table 1**). This again suggests that hybrid infections may potentially be more severe in humans compared to the pure parental species and need further considerations. One can wonder if this increased virulence of the hybrids would not be counterselected by the hosts in nature, or in contrary if it may allow the parasite to be more invasive.

The eggs produced by schistosomes are essential for parasitological diagnosis as they are indicative of the species responsible for infection. Because egg morphotypes may be affected during hybridization, thus misleading the diagnosis and hampering our ability to detect schistosome species, we characterised differences between hybrid and parental species egg morphology. *S. haematobium* eggs (voided by the urine) had a typical round to oval shape with a terminal spine (elliptical or elongated), while *S. bovis* eggs (released via the faeces) have an elongated shape (spindle). Some variability in size can be observed amongst species but eggs are sufficiently different so that one can easily differentiate *S. haematobium* [49–54] from *S. bovis* morphotypes [50,54,55].

We found that while heterospecific couples produced eggs that follow the morphotype of the maternal species (**Supplementary Figure 1 and 2**), they displayed an increase in size compared to the maternal species that could be problematic for the host in case of co-infections (**Table 2**). The second observation is that first generation F1 and F1' hybrid adults produced eggs in the range of size of both parental species and present an intermediate morphotype that does not allow to distinguish the parent of origin nor hybrid infections from pure species infections (**Table 2**). Previous study has already argued that egg morphology are not good indicators for hybrid schistosomes detection in Africa (Boon et al. 2017). We argue that only molecular tools can confirm the hybrid status of such parasites. After subsequent backcrossing events, we expect the egg morphotype to follow the genomic introgression levels of the parasite. This was the case for the hybrid schistosomes

that emerged in Corsica. Among the hundreds of eggs recovered from infected patients almost all had a classical *S. haematobium* shape [10,12], while a few seemed intermediate with *S. bovis*-type eggs [44] and this was consistent with the introgression levels estimated from the whole genome sequencing of the Corsican hybrid and a predominance of *S. haematobium* alleles [44].

Insights into the molecular basis of heterosis in Schistosomes

After characterising the life history trait modifications between the parental species and the first generation hybrids we were interested in identifying transcriptomic modifications associated with hybridization and phenotypic changes in offspring. Differential gene expression in combination with several other mechanisms such as epigenetic reprogramming and species-specific allelic gene expression may contribute to heterosis [22,56,57]. First generation hybrids benefit from an entire new set of alleles brought from the combination of the two parental species. This “genomic shock” as proposed by Barbara McClintock [40] usually results in a genome relaxation and in the activation of genetic mobile elements (and potential transposable elements), leading to new patterns of gene expression [41]. Interestingly, we found a significant enrichment of differentially expressed genes involved in response to stimulus (Table 4) and particularly response to stress thus suggesting the importance of the stress occasioned by the encounter of these two schistosome species genomes. Accordingly, genetic mobile elements such as transposons were found as over expressed in hybrids compared to parents.

Heterosis is a multigenic complex trait for which no consensus has yet been found. Some authors suggest that it may be brought by a cumulative effect of the differential expression of a variety of genes involved of one or several metabolic pathways affecting yield or energy use efficiency [56,58]. Therefore an important reprogramming of the hybrid transcriptome is expected after first generation crosses and this was observed in our work. Differentially expressed genes were enriched in general processes related to Biological adhesion (GO:0022610), Biological regulation (GO:0065007), Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840), Cellular process (GO: 0009987), Developmental process (GO:0032502), Growth (GO: 0040007), Immune system process (GO:0002376), Localization (GO:0051179), Locomotion (GO: 0040011), Metabolic process (GO:0008152), Multicellular

organismal process (GO:0032501), Reproduction (GO:0000003), Response to stimulus (GO:0050896), Signalling (GO:0023052), and Single organism process (GO:0044699) demonstrating the extent to which reprogramming is effected in these hybrids. Interestingly, in our work differentially expressed genes were also enriched in metabolic processes (carbohydrate metabolic process. lipid metabolic process. nitrogen compound metabolic process), which make sense in the light of heterosis as a metabolic reprogramming and an energy use efficiency mechanism [58,59]. While hybrids may display genomic incompatibilities leading to poorly viable offspring, others can outperform their parents and present an increased growth, reproductive potential and survival [16,43,60,61]. Clear evidence of modifications in developmental processes (embryo development. animal organ development. anatomical structure development and morphogenesis. multicellular organism development) arose from the enrichment analysis (**Table 4**). In addition, we identified an enrichment of genes involved in growth and reproduction. Indeed, hybrid worms are bigger than the parental species (not reported in this work yet observed), and have an increased prolificacy (as observed in F1 cross). We suspect that they developed earlier and that females started producing eggs before both parental species, as infected hamsters showed signs of infection before 60 days after infection, with some having to be perfused prematurely before death. The higher induced pathology of the hybrids towards the hosts is obviously a consequence of the higher number of infecting worms recovered and the increased prolificacy of these worms, but these hybrids also benefited from both species repertoires of antigens, potentially increasing the immune response of the host. Also, having coevolved with two different hosts, their own immune systems may slightly differ as shown by an enrichment of terms involved in the immune system process (GO:0002376). Another non exclusive hypothesis related to the enrichment of such immune functions is that it may contribute to a strategy to evade the host immune recognition system and therefore allowing more *cercariae* to develop into adult worms as seen from the increased infectivity of these hybrids.

In this context it is also important to stress the consequences that hybridization may have on drug sensitivity. Some other suggest that hybrid expansion in Africa could partly be due to a decrease in sensitivity of the only current drug (Praziquantel) used to cure schistosomiasis [6,43]. Others have also suggested that the low efficacy of *S. mattheei*

treatment in cattle was caused by hybridization between *S. mattheei* and *S. haematobium* [62]. This question is of great importance both in terms of human health and sustainable disease control. Overall, these transcriptomic modifications may be orchestrated by differences in gene expression of signalling pathways (signal transduction), which were also enriched in our DGE analysis. This work provides the first insight into the important molecular changes occurring during hybridization in schistosomes. Benefiting of this transcriptomic resource, the next step forward will be to deeply search for molecular mechanisms responsible for phenotypic changes and heterosis. Besides DGE, many others potential molecular mechanisms may contribute to heterosis. One interesting way would be to analyse allele specific gene expression in the hybrids. Recently, we found parental gene expression to occur in schistosome parasites with a potential implication of these genes in adult sex specific traits, sexual dimorphism including development and worm behaviour (Kincaid-smith et al. 2018). According to the influence that the paternal genome may have on the behaviour of its progeny, we can hypothesize that a male specific trait such as female transport may be dependant on the paternal species of the cross.

Conclusion

This work brings a new contribution to the understanding of the consequences of hybridization on the biology and epidemiology of schistosomes that may contribute to make them an emerging global threat. First, the life history trait analysis in the present work, confirming precedent studies clearly shows that hybridization in schistosomes may affect the resulting offspring transmission potential and in some cases induce heterosis. The increased transmission potential found in this work was accompanied by a high morbidity towards the vertebrate host and needs to be considered in a human health context. Second our transcriptome sequencing approach revealed that differential gene expression is highly affected by hybridization and suggest an important transcriptome reprogramming in the offspring. Important functions linked to schistosome's hybridization and potentially the heterosis were identified with an overrepresentation of metabolic pathways, developmental processes, growth and reproduction processes. Further work will be needed to fully decipher the full molecular basis of heterosis in schistosomes. Because hybridization between *S. haematobium* and *S. bovis* is more and more identified, further studies are needed to i) assess the hybridization potential of these parasites through mating

experiments, ii) assess the effect of hybridization on hybrids sensitivity towards the only current treatment for the disease (Praziquantel), and iii) assess the future of schistosomiasis both in endemic countries and disease outbreaks in unanticipated environment like recently observed in Europe. This all together could lead to issues in the disease control including alteration in efficiency of current chemotherapeutic treatments, thus raising the importance for health authorities to implement adequate procedures allowing sustainable disease control and limiting schistosomiasis spread.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Génome Québec and University McGill innovation center as well as Roscoff Bioinformatics platform ABiMS (<http://abims.sb-roscoff.fr>) and NGS facility at the bio-environment platform (University of Perpignan)

Supplementary Tables and Figures

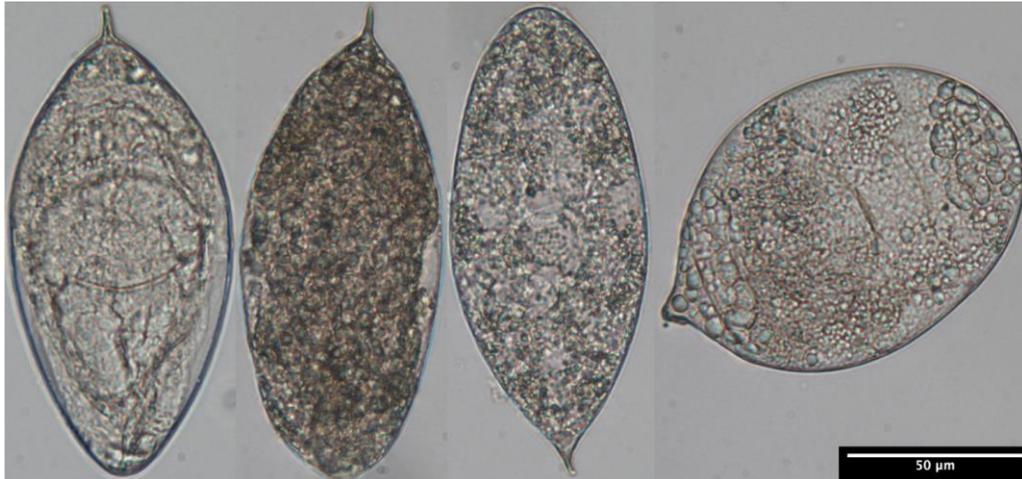
Supplementary Table S1: Life history trait measurements for each individual hamster

	<i>Cercariae</i> infectivity	Nb. of couples	Sex-ratio (males/females)	Nb. of eggs per female	Nb. of eggs per day	Nb. of eggs per day per female	Splenomegaly	Hepatomegaly
<i>S. bovis</i> <i>n=6</i>	0.22	60	1.22	2187	2187	36	0.0019	0.0408
	0.20	58	1.05	2818	2724	46	0.0030	0.0466
	0.17	49	1.04	2452	2002	40	0.0026	0.0456
	0.16	45	0.90	1841	1381	30	0.0021	0.0448
	0.08	19	0.61	1693	536	28	0.0015	0.0418
	0.28	80	1.13	2755	3674	45	0.0033	0.0444
<i>S. haematobium</i> <i>n=6</i>	0.22	63	0.95	1605	1685	26	0.0013	0.0496
	0.26	29	0.23	2287	1105	38	0.0022	0.0465
	0.19	47	0.68	579	469	9	0.0013	0.0432
	0.23	48	0.52	641	531	11	0.0015	0.0393
	0.21	47	0.59	924	749	15	0.0017	0.0364
	0.18	43	1.49	1452	1076	25	0.0018	0.0488
F1 <i>n=5</i>	0.66	152	1.59	1480	6081	40	0.0041	0.0509
	0.08	20	1.40	6862	298	114	0.0047	0.0553
	0.33	49	1.04	2179	232	36	0.0030	0.0447
	0.09	14	0.40	19488	593	324	0.0045	0.0505
	0.74	171	1.3	2200	818	36	0.0043	0.0369
F1'	0.41	120	1.03	567	1334	11	0.0023	0.0458
	0.31	49	2.84	1125	919	18	0.0088	0.0652
	0.30	44	1.41	1766	1295	29	0.0038	0.0566
	0.31	90	1.04	584	876	9	0.0026	0.0518
	0.15	45	1.00	1019	764	17	0.0048	0.0390
Healthy hamsters <i>n=6</i>	-						0.0010	0.0418
							0.0011	0.0385
							0.0013	0.0410
							0.0012	0.0364
							0.0009	0.0404
						0.0012	0.0311	

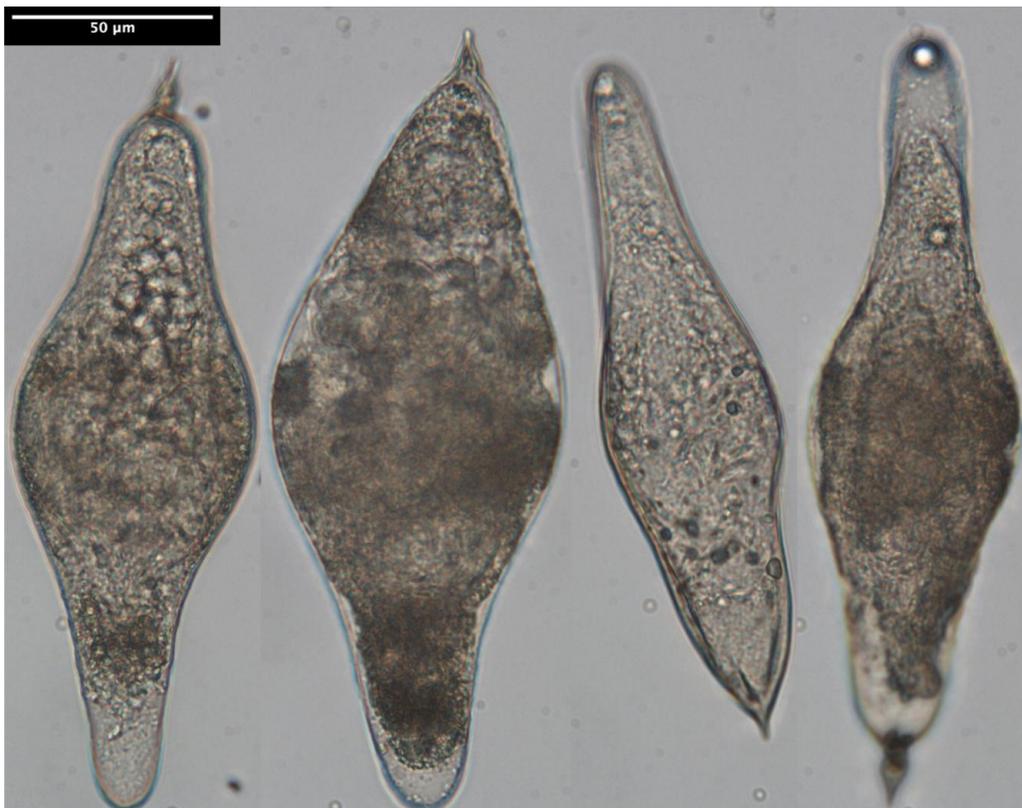
Supplementary Table S2: Metrics of the RNA-sequencing reads processing

Samples Nb. and Species or cross information	Nb. Raw reads	Unique mapped reads (RNA-Star)	Multiple mapped reads (RNA-Star)	Counted reads HTseq count)
Males 1 <i>S. haematobium</i>	24.741.021	18.372.269 (74.26%)	4.115.198 (16.63%)	18.372.269
Males 2 <i>S. haematobium</i>	25.665.693	19.133.591 (74.55%)	4.220.820 (16.45%)	19.133.591
Males 3 <i>S. haematobium</i>	27.150.103	20.266.097 (74.64%)	4.481.239 (16.51%)	20.266.097
Females 1 <i>S. haematobium</i>	42.363.412	30.934.233 (73.02%)	6.275.114 (14.81%)	30.934.233
Females 2 <i>S. haematobium</i>	36.135.286	26.635.935 (73.71%)	4.968.477 (13.75%)	26.635.935
Females 3 <i>S. haematobium</i>	30.454.409	22.296.299 (73.21%)	4.520.055 (14.84%)	22.296.299
Males 1 <i>S. bovis</i>	26.012.418	19.169.259 (73.69%)	3.735.754 (14.36%)	19.169.259
Males 2 <i>S. bovis</i>	25.121.738	18.614.095 (74.10%)	3.613.849 (14.39%)	18.614.095
Males 3 <i>S. bovis</i>	34.734.398	25.693.655 (73.97%)	5.555.956 (16.00%)	25.693.655
Females 1 <i>S. bovis</i>	33.423.222	24.475.812 (73.23%)	5.118.900 (15.32%)	24.475.812
Females 2 <i>S. bovis</i>	29.923.046	21.382.956 (71.46%)	4.890.182 (16.34%)	21.382.956
Females 3 <i>S. bovis</i>	32.310.467	23.305.483 (72.13%)	4.746.653 (14.69%)	23.305.483
Males 1 F1	35.828.047	26.684.946 (74.48%)	5.615.894 (15.67%)	26.684.946
Males 2 F1*** (excluded from DGE analysis)	25.754.837	18.684.370 (72.55%)	3.968.466 (15.41%)	18.684.370
Males 3 F1	36.028.695	26.764.092	5.410.908 (15.02%)	26.764.092

		(74.29%)		
Females 1 F1	30.386.935	21.979.872 (72.33%)	4.354.084 (14.33%)	21.979872
Females 2 F1	28.707.185	20.859.991 (72.66%)	4.009.544 (13.97%)	20.859.991
Females 3 F1	29.442.508	21.232.138 (72.11%)	4.185.288 (14.22%)	21.232.138
Males 1 F1'	31.607.013	23.552.174 (74.52%)	5.107.166 (16.16%)	23.552.174
Males 2 F1'	27.147.157	20.158.225 (74.26%)	4.447.514 (16.38%)	20.158.225
Males 3 F1'	29.783.985	22.234.982 (74.65%)	4.762.797 (15.99%)	22.234.982
Females 1 F1'	28.940.964	20.909.841 (72.25%)	4.381.978 (15.14%)	20.909.841
Females 2 F1'	34.218.186	24.753.159 (72.34%)	5.145.039 (15.04%)	24.753.159
Females 3 F1'	30.169.225	21.975.022 (72.84%)	4.183.562 (13.87%)	21.975.022



Supplementary Figure S1: Photographs of F1 parent (♀ *S. haematobium* x ♂ *S. bovis* males) eggs using light microscopy with objective lens magnification of x25 (Scale bar: 50μm). Notice that egg shapes representative of the maternal species producing the eggs shell.



Supplementary Figure S2: Photographs of F1' parent (♀ *S. bovis* females x ♂ *S. haematobium*) eggs using light microscopy with objective lens magnification of x25 (Scale bar: 50μm). Notice that egg shapes representative of the maternal species producing the eggs shell.

References

1. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*. Elsevier; 2006;6:411–425. doi:10.1016/S1473-3099(06)70521-7
2. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8. doi:10.1371/journal.pntd.0002865
3. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet* (London, England). 2014;383: 2253–2264. doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2
4. Bont J De, Vercruyse J. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis: a review. *Parasitol Today*. 1997;
5. Léger E, Webster JP. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology*. 2016; 1–16. doi:10.1017/S0031182016001190
6. Huyse T, Webster BL, Geldof S, Stothard JR, Diaw OT, Polman K, et al. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathog*. 2009;5. doi:10.1371/journal.ppat.1000571
7. Boon, N.A.M, Van de Broeck F., Faye D., Volckaert F.A.M., Mboup S, Polman K, et al. Barcoding hybrids: heterogeneous distribution of *Schistosoma haematobium* × *Schistosoma bovis* hybrids across the Senegal River Basin. *Parasitology*. 2018: 1–12. doi:10.1017/S0031182018000525
8. Huyse T, Van den Broeck F, Hellemans B, Volckaert FAM, Polman K. Hybridisation between the two major African schistosome species of humans. *Int J Parasitol*. Australian Society for Parasitology Inc.; 2013;43: 687–689. doi:10.1016/j.ijpara.2013.04.001
9. Brémond P, Sellin B, Sellin E, Naméoua B, Labbo R, Théron A, et al. Arguments for the modification of the genome (introgression) of the human parasite *Schistosoma haematobium* by genes from *S. bovis*, in Niger. *C R Acad Sci III*. 1993;316: 667–670.
10. Moné H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsá-Nguéma R, Ibikounlé M, Boissier J, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol Res*. 2015;114: 4127–4133. doi:10.1007/s00436-015-4643-4
11. Léger E, Garba A, Hamidou AA, Webster BL, Pennance T, Rollinson D, et al.

- Introgressed Animal Schistosomes *Schistosoma curassoni* and *S. bovis* naturally infecting humans. *Emerging infectious diseases*. 2016;22: 2212–2215.
12. Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, Allienne J-F, Huyse T, Mas-Coma S, et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;3099: 1–9. doi:10.1016/S1473-3099(16)00175-4
 13. Webster BL, Diaw OT, Seye MM, Webster JP, Rollinson D. Introgressive Hybridization of *Schistosoma haematobium* Group Species in Senegal: Species Barrier Break Down between Ruminant and Human Schistosomes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7. doi:10.1371/journal.pntd.0002110
 14. Berry A, Fillaux J, Martin-Blondel G, Boissier J, Iriart X, Marchou B, et al. Evidence for a permanent presence of Schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Eurosurveillance*. 2016;21: 5–8. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.1.30100
 15. Ramalli L, Mulero S, Noël H, Chiappini JD, Vincent J, Barré-Cardi H, et al. Persistence of schistosomal transmission linked to the cavu river in southern Corsica since 2013. *Eurosurveillance*. 2018;23: 2–5. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017
 16. Webster BL, Southgate VR. Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology*. 2003;127: 231–242. doi:10.1017/S0031182003003597
 17. Wright CA, Ross GC. Hybrids between *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei* and their identification by isoelectric focusing of enzymes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74: 326–332. doi:10.1016/0035-9203(80)90091-7
 18. Tchuem Tchuente LA, Southgate VR, Jourdane J, Kaukas A, Vercruyssen J. Hybridisation between the digeneans *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei*: Viability of hybrids and their development in sheep. *Syst Parasitol*. 1997;36: 123–131. doi:10.1023/A:1005705030619
 19. Wright CA, Ross GC. Hybrids between *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei* and their identification by isoelectric focusing of enzymes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Elsevier; 1980;74: 326–332.
 20. Tchuente LAT, Southgate VR, Njiokou F, Njiné T, Koueméni LE, Jourdane J. The evolution of schistosomiasis at Loum, Cameroon: replacement of *Schistosoma intercalatum* by *S. haematobium* through introgressive hybridization. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91: 664–665. doi:10.1016/S0035-9203(97)90513-7
 21. Catalano S, Sène M, Diouf ND, Fall CB, Borlase A, Léger E, et al. Rodents as Natural Hosts of Zoonotic *Schistosoma* Species and Hybrids: An Epidemiological and Evolutionary Perspective From West Africa. *J Infect Dis*. 2018; jiy029.

doi:10.1093/infdis/jiy029

22. Bar-Zvi D, Lupo O, Levy AA, Barkai N. Hybrid vigor: The best of both parents, or a genomic clash? *Curr Opin Syst Biol*. Elsevier Ltd; 2017;6: 22–27. doi:10.1016/j.coisb.2017.08.004
23. Silva ML, Vicente FS, Avelino IC, Martin VR. Susceptibility of *Planorbarius metidjensis* from Portugal and Spain to *Schistosoma bovis* from Salamanca, Spain. *Malacologia*. 1977;16: 251–254.
24. Kincaid-Smith J, Boissier J, Allienne JF, Oleaga A, Djuikwo-Teukeng F, Toulza E. A Genome Wide Comparison to Identify Markers to Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 2016;10: e0005138. doi:10.1371/journal.pntd.0005138
25. Boissier J, Rivera ER, Moné H. Altered behavior of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 2003;89: 429–433. doi:10.1645/0022-3395(2003)089[0429:ABOTSB]2.0.CO;2
26. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 2003;91: 144–150. doi:10.1007/s00436-003-0943-1
27. Théron a, Pages JR, Rognon a. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Exp Parasitol*. 1997;85: 1–9. doi:10.1006/expr.1996.4106
28. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with imageJ. *Biophotonics International*. 2004. pp. 36–41. doi:10.1117/1.3589100
29. Prodanov D, Verstreke K. Automated Segmentation and Morphometry of Cell and Tissue Structures. Selected Algorithms in ImageJ. *Molecular Imaging*. 2012. doi:10.5772/36729
30. Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, et al. Galaxy: A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res*. 2005;15: 1451–1455. doi:10.1101/gr.4086505
31. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Afgan E, Ananda G, Baker D, et al. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol*. 2010;11. doi:10.1186/gb-2010-11-8-r86
32. Blankenberg D, Gordon A, Von Kuster G, Coraor N, Taylor J, Nekrutenko A, et al.

- Manipulation of FASTQ data with galaxy. *Bioinformatics*. 2010;26: 1783–1785. doi:10.1093/bioinformatics/btq281
33. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011;17: 10. doi:10.14806/ej.17.1.200
 34. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2011;29: 644. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1883>
 35. Davidson NM, Hawkins ADK, Oshlack A. Erratum: SuperTranscripts: A data driven reference for analysis and visualisation of transcriptomes. *Genome Biol.*, 18, 1, (2017)(148). DOI: 10.1186/s13059-017-1284-1.
 36. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29: 15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
 37. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31: 166–169. doi:10.1093/bioinformatics/btu638
 38. Love MI, Anders S, Huber W. Differential analysis of count data - the DESeq2 package [Internet]. *Genome Biology*. 2014. doi:110.1186/s13059-014-0550-8
 39. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. Oxford University Press; 2005;21: 3674–3676.
 40. McClintock B. The significance of response of the genome to challenge. *Science*. 1984;226: 792–801. doi:<http://dx.doi.org/10.1126/science.15739260>
 41. Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, et al. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in Arabidopsis interspecific hybrids and allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106: 17835–17840. doi:10.1073/pnas.0907003106
 42. Jourdane J, Imbert-Establet D, Tchuente LAT. Parthenogenesis in schistosomatidae. *Parasitol Today*. Elsevier; 1995;11: 427–430.
 43. Webster BL, Diaw OT, Seye MM, Webster JP, Rollinson D. Introgressive Hybridization of Schistosoma haematobium Group Species in Senegal: Species Barrier Break Down between Ruminant and Human Schistosomes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7. doi:10.1371/journal.pntd.0002110

44. Kincaid-Smith J, Tracey A, de Carvalho Augusto R, Bulla I, Holroyd N, Rognon A, et al. Whole genome sequencing and morphological analysis of the human-infecting schistosome emerging in Europe reveals a complex admixture between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory; 2018; doi:10.1101/387969
45. Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA, Rollinson D. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasit Vectors*. BioMed Central Ltd; 2011;4: 131. doi:10.1186/1756-3305-4-131
46. Webster BL. On the interactions of *Schistosoma haematobium*, *S. guineensis* and their hybrids in the laboratory and in the field. London Univ Coll London. 2003;
47. Wright CA, Southgate VR, Van Wijk HB, Moore PJ. Hybrids between *Schistosoma haematobium* and *S. intercalatum* in Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. No longer published by Elsevier; 1974;68: 413–414.
48. Wolff JN, Ladoukakis ED, Dowling DK, Dowling DK. Mitonuclear interactions : evolutionary consequences over multiple biological scales. 2014;
49. Capron, A., Deblock, S., Biguet, J., Clay, A., Adenis, L. & Vernes, A., 1965. Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à *Schistosoma haematobium*. *Bulletin of the World Health Organization*, 32(6), p.755.
50. Pitchford, R.J., 1965. Differences in the Egg Morphology and Certain Biological Characteristics of Some African and Middle Eastern Schistosomes, Genus *Schistosoma*, with Terminal-Spined Eggs. *Bulletin of the World Health Organization*, 32, pp.105–120.
51. Moné H, Minguez S, Ibikounlé M, Allienne JF, Massougbodji A, Mouahid G. Natural interactions between *S. haematobium* and *S. guineensis* in the Republic of Benin. *Sci World J*. 2012;2012: 793420. doi:10.1100/2012/793420
52. Loker ES. A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology*. Cambridge University Press; 1983;87: 343–369.
53. Richard-Lenoble D, Kombila M, Duong TH, Gendrel D. Bilharziasis caused by *Schistosoma intercalatum*, a recent and forgotten form of schistosomiasis. *Rev Prat*. 1993;43: 432–439.
54. Alves W. The Eggs of *Schistosoma bovis*, *S. mattheei* and *S. haematobium*. *J Helminthol*. 2009/11/18. Cambridge University Press; 1948;23: 127–134. doi:10.1017/S0022149X00032466
55. Rollinson D, Southgate VR, Vercruyse J, Moore PJ. Observations on natural and experimental interactions between *Schistosoma bovis* and *S. curassoni* from West

- Africa. *Acta Trop.* 1990;47: 101–114. doi:10.1016/0001-706X(90)90072-8
56. Baranwal VK, Mikkilineni V, Zehr UB, Tyagi AK, Kapoor S. Heterosis: emerging ideas about hybrid vigour. *J Exp Bot.* England; 2012;63: 6309–6314. doi:10.1093/jxb/ers291
 57. Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S. Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 12957–12958. doi:10.1073/pnas.0605627103
 58. Goff SA. A unifying theory for general multigenic heterosis: energy efficiency, protein metabolism, and implications for molecular breeding. *New Phytol.* 2011;189: 923–937. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03574.x
 59. Baranwal VK, Mikkilineni V, Zehr UB, Tyagi AK, Kapoor S. Heterosis: Emerging ideas about hybrid vigour. *J Exp Bot.* 2012;63: 6309–6314. doi:10.1093/jxb/ers291
 60. Southgate VR, Wijk HB, Wright CA. Schistosomiasis at Loum, Cameroun; *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their natural hybrid. *Zeitschrift für Parasitenkd.* 1976;49: 145–159. doi:10.1007/BF00382422
 61. Wright AE, Moghadam HK, Mank JE. Trade-off between selection for dosage compensation and masculinization on the avian Z chromosome. *Genetics.* 2012;192: 1433–1445. doi:10.1534/genetics.112.145102
 62. Pitchford RJ, Lewis M. Oxamniquine in the treatment of various schistosome infections in South Africa. *S Afr Med J.* 1978;53: 677–680.

2) Évolution expérimentale chez *S. haematobium* x *S. bovis* et analyse de l'influence du niveau d'introgession sur les modifications des traits d'histoire de vie des parasites

Suite à la production d'hybrides de première génération (**Chapitre 3.1**). Nous avons poursuivi notre protocole d'évolution expérimentale. Nous avons produit des lignées hybrides de seconde génération (F2 et F2') ainsi que des rétrocroisements entre hybrides de première génération et espèces parentales. Ceci nous a permis de produire des hybrides présentant des niveaux d'introgession génomique différentiels (en direction de *S. haematobium* ou de *S. bovis*), et représentatifs d'un panel de parasites potentiellement présent dans la nature.

Nous avons ensuite analysé les modifications de traits d'histoire de vie de ces parasites et de leurs hôtes. Nous avons analysé les traits de vie chez les deux hôtes mollusque et vertébré. Les mollusques que nous avons utilisés sont d'origines différentes (Europe et Afrique). Une souche de *B. truncatus* est originaire du Cameroun (Lac de Barombi Kotto), une d'Espagne (Almeria) et une de Corse (rivière du Cavu), tandis que *P. metidjensis* est originaire d'Espagne (Almeria). Les espèces de parasites (**Tableau 4**) et les mollusques utilisés dans ce travail ont été maintenus pendant la durée de l'expérience au laboratoire de l'IHPE.

Tableau 4 : Espèces parentales des parasites utilisés dans ce travail et souche naturelle de l'hybride utilisé pour la comparaison des traits d'histoire de vie

Espèces parentales et souche du parasite hybride	Site	Année d'isolement	Références
<i>S. haematobium</i>	Barombi Kotto Lake, (Cameroun)	2015	(Kincaid-Smith et al. 2016)
<i>S. bovis</i>	Villar de la Yegua-Salamanca, (Espagne)	1970	(Silva et al. 1977)
<i>S. haematobium</i> x <i>S. bovis</i>	Cavu River, Corsica, (France)	2014	(Boissier et al. 2016; Moné et al. 2015)

a) Vue d'ensemble du protocole d'évolution expérimentale

Comme précédemment (**Chapitre 3.1**) nous avons utilisé notre souche consanguine de *S. haematobium* pour poursuivre les croisements. Les méthodes employées pour les infections de mollusques et de rongeurs, ainsi que la perfusion hépatique ont été décrites précédemment (Jérôme Boissier, Rivera, and Moné 2003; J. Boissier et al. 2003; Théron, Pages, and Rognon 1997). Le protocole d'évolution expérimentale consistait à 1) infecter des hamsters avec des couples de vers homo-spécifiques représentant nos espèces parentales (*S. haematobium* et *S. bovis*), 2) produire des hybrides réciproques de première génération (F1 et F1') (**Figure 7**). À partir de ces hybrides de première génération nous avons 3) produit des hybrides de seconde génération F2 (F1 x F1) et F2' (F1' x F1') (**Figure 7**), et 4) rétrocroisé ces hybrides de première génération avec les espèces parentales de manière réciproque afin d'introgresser les génomes de chaque lignée de parasite hybride en direction de l'une ou l'autre des espèces parentales (**Figure 8**). Nous avons donc travaillé sur un total 15 lignées: 1 souche isolée en Corse, 2 souches parentales pures (*S. bovis* et *S. haematobium*), 2 souches F1, 2 souches F2 et 8 souches rétrocroisées.

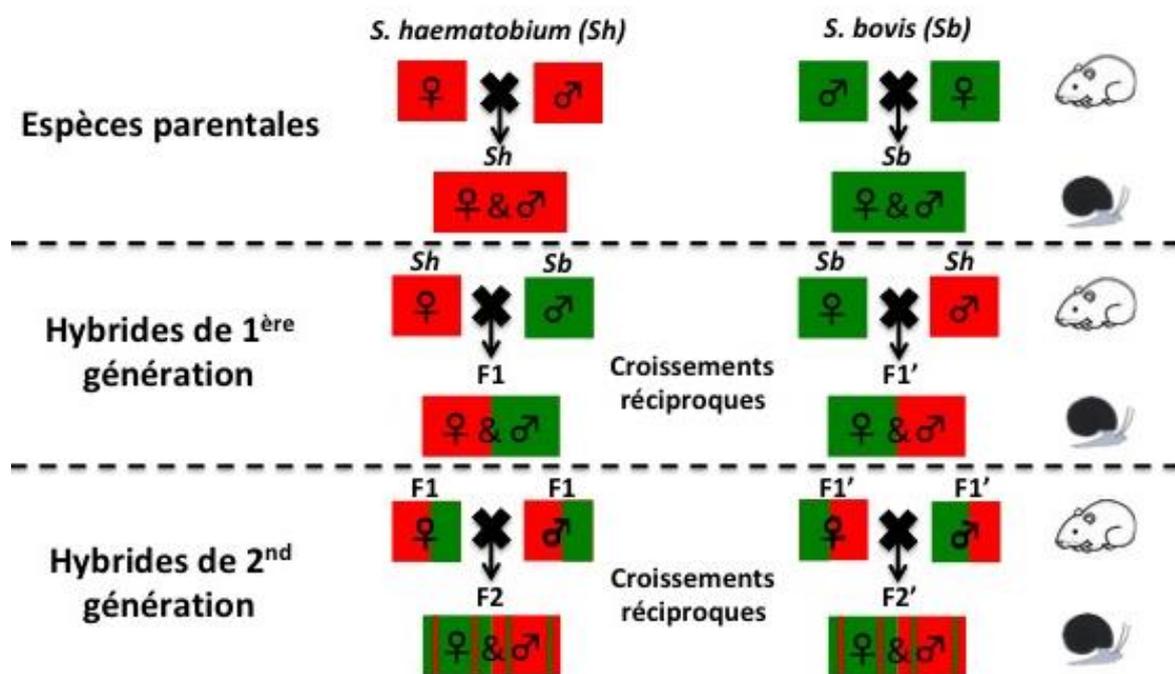


Figure 7 : Protocole d'évolution expérimentale. Le panneau supérieur indique les espèces parentales. Les hybrides de première génération issus de croisements réciproque sont produits à partir des espèces parentales F1 (♀ Sh x ♂ Sb) et F1' (♀ Sb x ♂ Sh) et sont ensuite utilisés pour produire la génération F2 (F1 x F1) et F2' (F1' x F1').

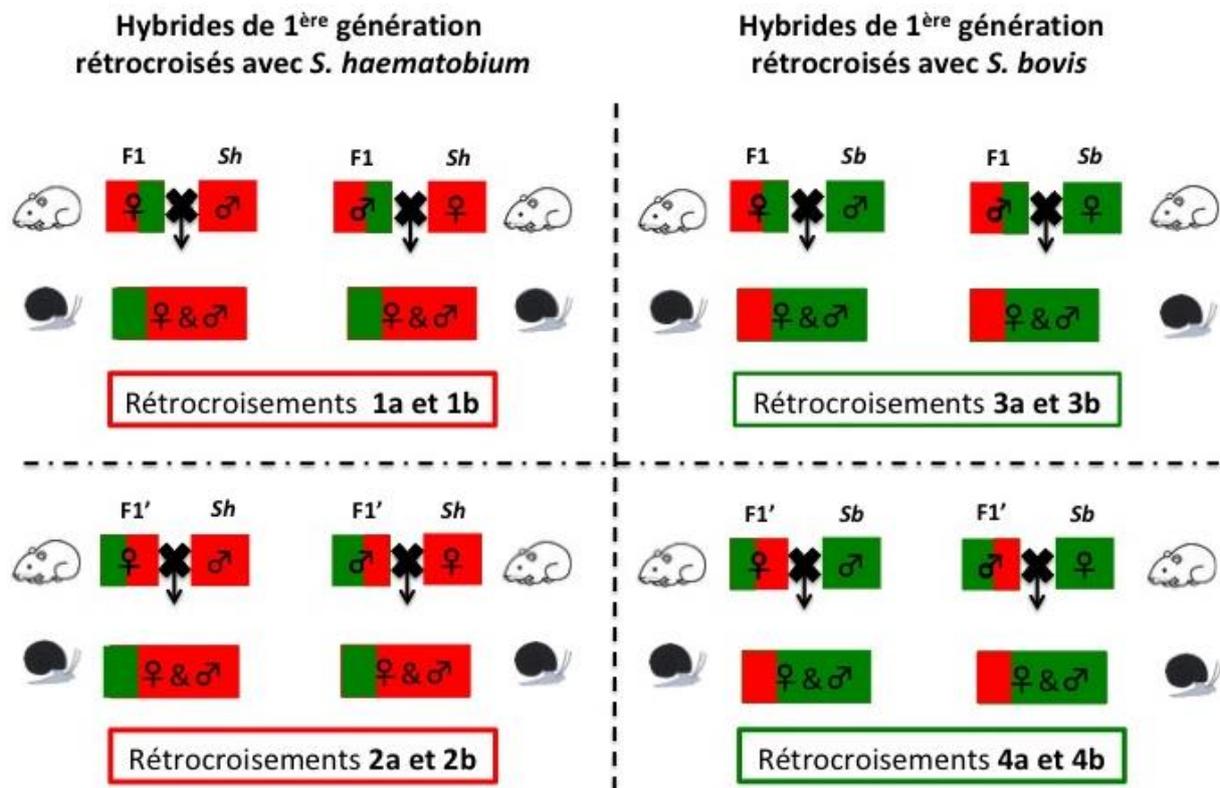


Figure 8 : Protocole d'évolution expérimentale (suite). Les hybrides de première génération sont également réciproquement rétrocroisés soit avec *S. bovis*, soit avec *S. haematobium*. L'analyse des traits d'histoire de vie dans l'interaction avec les hôtes intermédiaires ou définitifs est représentée sur la figure par un mollusque et un rongeur.

b) Détail du protocole d'infestation des hamsters et des mollusques

- **Maintien des lignées parentales *S. haematobium*, *S. bovis* et souche Corse**

Les trois souches initiales (*S. haematobium*, *S. bovis* et hybride naturel de Corse) sont maintenues au laboratoire par des passages successifs sur hamsters et sur leurs mollusques sympatriques respectifs.

- **Production des hybrides réciproques de première génération (F1 et F1') (Figure 7)**

Des mollusques sont exposés à un seul miracidium des souches parentales décrites ci-dessus. Environ cinq à six semaines après les infestations, les cercaires émises par les mollusques positifs sont sexées par PCR (Kincaid-Smith et al. 2016). Des lots de six hamsters par combinaison ($n = 2 \times 6$) ont été infectés par des combinaisons hétérosécifiques de cercaires de 300 femelles *S. haematobium* et 300 mâles *S. bovis* (parents F1; $n = 6$) ou 300 mâles *S. haematobium* et 300 femelles *S. bovis* (parents F1', $n = 6$). Cent-dix jours après

l'infection, les hamsters contenant les parents des hybrides (couples hétérosécifiques) ont été euthanasiés. Les œufs hybrides ont été récoltés à partir du foie des hamsters infectés. Les *miracidia* hybrides ont été prélevés à partir d'œufs éclos dans de l'eau douce et utilisés pour exposer nos différentes souches de mollusques à 5 *miracidia*. Environ 35 jours après avoir exposé les mollusques aux parasites, les cercaires hybrides F1 et F1' ont été utilisés pour infecter des hamsters ($n = 2 \times 7$) avec des lots de 600 cercaires. Les vers adultes F1 et F1' ont été prélevés à 90 jours après l'infection par perfusion hépatique et dissection des mésentères.

- **Création des lignées de seconde génération (Figure 7)**

Les lignées de seconde génération sont obtenus par reproduction des F1 (F1 x F1) et F1' (F1' x F1'), respectivement. Les œufs produits par ces croisements sont donc récoltés à partir du foie des hamsters infectés et utilisés pour exposer nos différentes souches de mollusques à 5 *miracidia* de F2 et F2' respectivement (notez qu'aucun hamster n'a ensuite été infecté par des cercaires de seconde génération).

- **Lignées rétrocroisées (Figure 8)**

C'est à partir des croisements F1 et F1' nous avons effectué des rétrocroisements avec les souches parentales. Les hamsters ont été infectés soit avec des hybrides F1 ou F1' (mâles ou femelles) en association avec des mâles ou femelles de *S. haematobium* purs (rétrocroisements 1a, 1b, et 2a, 2b, $n = 4 \times 6$ hamsters) ou des mâles et femelles de *S. bovis* purs (rétrocroisements 3a, 3b et 4a, 4b, $n = 4 \times 6$ hamsters) en utilisant 300 cercaires de chaque sexe et espèces (ou lignées). Trois mois après l'infestation, les œufs ont été récupérés et les *miracidia* ont été utilisés pour infecter les mollusques. Les 8 combinaisons de rétrocroisement après leur passage sur mollusques ont permis d'infecter des hamsters ($n = 8 \times 6$ hamsters) avec des lots de 600 cercaires afin de récupérer 90 jours plus tard les vers adultes (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b) de chaque sexe. Tous les hamsters et mollusques ont été soumis aux mêmes mesures de traits d'histoire de vie en suivant les mêmes conditions et procédures expérimentales.

c) Analyses des traits d'histoire de vie des espèces parentales et des lignées hybrides

Les traits d'histoires de vie analysés sont présentés dans la **Figure 9** et se focalisent sur l'interaction du parasite avec son hôte définitif de laboratoire, le hamster doré *Mesocricetus auratus*, ainsi que ses potentiels hôtes mollusques vecteurs (*Bulinus* et *Planorbarius*).

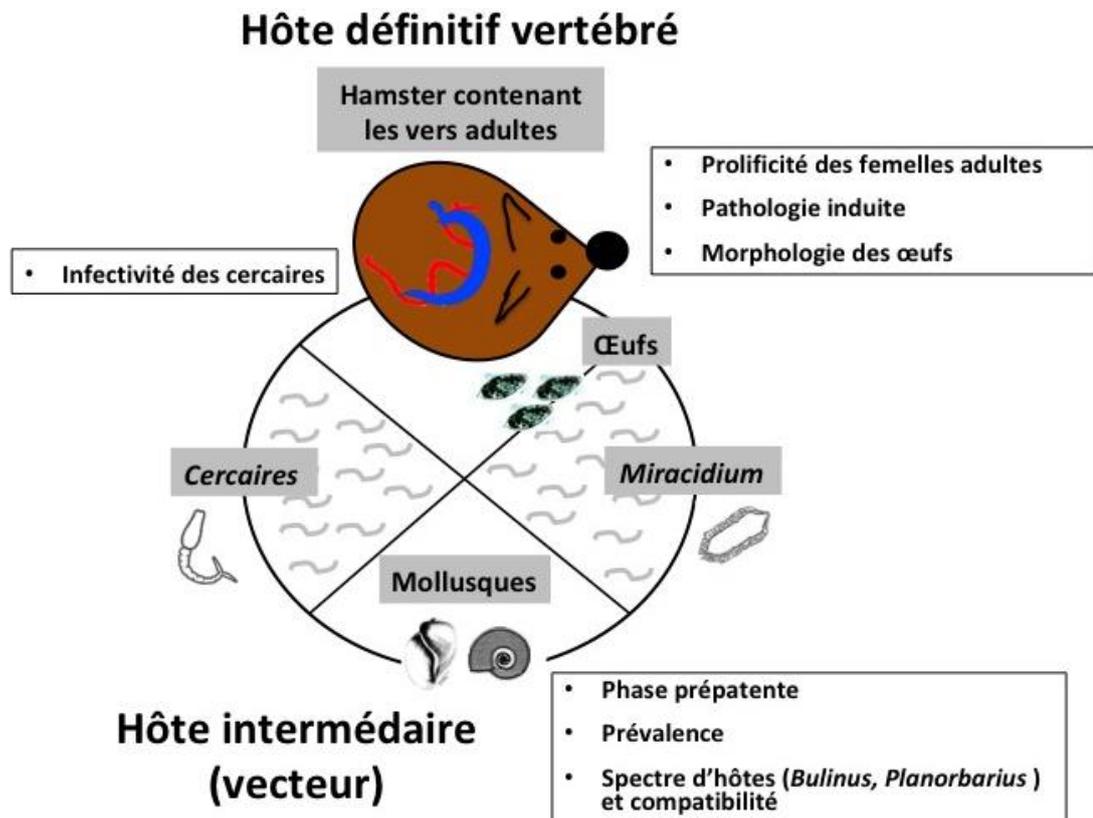


Figure 9: Synthèse des traits d'histoire de vie analysés en fonction des différentes étapes du cycle de vie des schistosomes.

a) Interaction Schistosomes-Mollusques

L'infection des mollusques a été réalisée en les exposant à 5 *miracidia* d'une espèce ou lignée hybride de parasites. Les mollusques ont ensuite été placés dans des bacs et nourris *ad libitum*. La **phase pré-patente** du parasite correspond au temps de développement du parasite chez les mollusques avant l'émission des premières cercaires, tandis que la **prévalence** correspond au nombre de mollusques infectés par rapport au nombre total de mollusques exposés aux parasites. Pour évaluer cette période de prépatence et la prévalence, les mollusques infectés ont été inspectés pour la présence de cercaires après stimulation de l'émission cercarienne par la lumière à 20, 28, 35, 42, et 49 jours après les

infections. Ces paramètres sont indicatifs du degré de compatibilité de l'association parasite-mollusque et de la capacité invasive des parasites.

b) Interaction schistosomes-vertébré

Nous avons ensuite analysé les traits d'histoire de vie des parasites en interaction avec l'hôte définitif de laboratoire en suivant le protocole établi dans la partie précédente de cette thèse (**Chapitre 3.1**). Nous avons mesuré l'**infectivité** des cercaires, estimé la **prolificité** des femelles en comptant le nombre d'œufs situés dans le foie des hamsters ainsi que la **pathologie induite** (hépatosplénomégalie) en mesurant une surcroissance de la rate ou du foie. Pour finir nous avons analysé la **morphologie** des œufs des différentes lignées hybrides en comparaison avec leurs espèces parentales. Les détails de la méthodologie employée ont été présentés précédemment.

d) Analyses statistiques

Les prévalences de parasites ont été comparées par des tests de χ^2 suivis de tests exacts de Fisher. Les traits d'histoires de vie (infectivité, prolificité, pathologie induite) ont été comparés à l'aide de test H de Kruskal-Wallis, suivi de comparaisons par paires grâce à un test de Dunn. La morphologie des œufs a été comparée par des tests ANOVA à un facteur suivi de test Post Hoc (test de Scheffe). L'ensemble des tests ont été effectués sur SPSS v20.0 et considérés significatifs à un seuil alpha de 5%.

Résultats

c) Interaction schistosomes-mollusques

- Durée de la période prépatente

Les souches parentales de *S. bovis* et *S. haematobium* ont des phénotypes contrastés vis à vis de la durée de la période prépatente. Tandis que les premières cercaires sont émises à partir de 20 jours après l'exposition pour *S. bovis*, les cercaires de *S. haematobium* commencent à sortir à partir de 28 jours (**Tableau 5**). L'hybride Corse a une durée de phase prépatente similaire à *S. haematobium*. Afin d'estimer l'influence du croisement sur la durée de la période prépatente nous avons catégorisé les lignées en lignées précoces (mollusques émetteurs à partir de 20) et lignées tardives mollusques émetteurs à 28 jour) (**Tableau 5**).

De façon intéressante les premières et secondes générations héritent de la durée de la phase prépatente de l'espèce maternelle à l'origine du croisement. Les rétrocroisements suivent la durée de la phase prépatente de l'espèce parentale pure avec laquelle ils sont rétrocroisés (**Tableau 5**). Cela montre que l'espèce dicte la durée de phase prépatente des lignées hybrides, mais suggère aussi que ces hybrides peuvent subir une diminution de leur temps de développement dans le mollusque s'ils sont croisés avec une espèce plus précoce. Notons que la durée de la période prépatente n'a été testée qu'à partir de 20 jours après l'exposition. Il est donc possible que les hybrides aient acquis un développement plus précoce avec une phase prépatente inférieure à 20 jours.

Tableau 5 : Synthèse de la durée de la phase prépatente pour les espèces parentales et les lignées hybrides. Pour les lignées dont la phase prépatente est de 28 jours, aucun mollusque n'émettait de cercaire à 20 jours.

Lignées « précoces » Proportion de mollusques positifs à 20 jours	Lignées « tardives » Proportion de mollusques positifs à 28 jours
<i>S. bovis</i> 31/130 (24%)	<i>S. haematobium</i> 30/383 (8%)
F1' 107/394 (27%)	Hybride corse 2/104 (2%)
♀ F1' x ♂ Sb 36/99 (36%)	F1 132/346 (38%)
♀ F1 x ♂ Sb 2/150 (1%)	♀ F1' x ♂ Sh 12/142 (8%)
♂ F1' x ♀ Sb 12/159 (8%)	♀ F1 x ♂ Sh 31/162 (19%)
♂ F1 x ♀ Sb 27/130 (21%)	♂ F1' x ♀ Sh 37/133 (28%)
F2' 2/89 (2%)	♂ F1 x ♀ Sh 28/118 (24%)

- Compatibilité

Nous avons ensuite déterminé la compatibilité de l'interaction hôte-parasite à 35 jours après l'exposition des mollusques aux parasites (**Figure 10**). Les détails de prévalences et mortalités des mollusques sur la totalité de la période d'observation sont disponibles en **Annexe 1 Tableau A1-A15**. Pour plus de clarté nous avons décidé de comparer successivement :

- (i) les prévalences des souches de mollusques indépendamment des lignées de parasite
- (ii) les prévalences des deux lignées parentales pures pour chaque souche de mollusques
- (iii) les prévalences de l'hybride naturel Corse
- (iv) les prévalences des hybrides F1 et F1' vis-à-vis des prévalences des parents purs
- (v) les prévalences des lignées rétrocroisées avec les souches parentales pures
- (vi) les lignées F2 et F2'

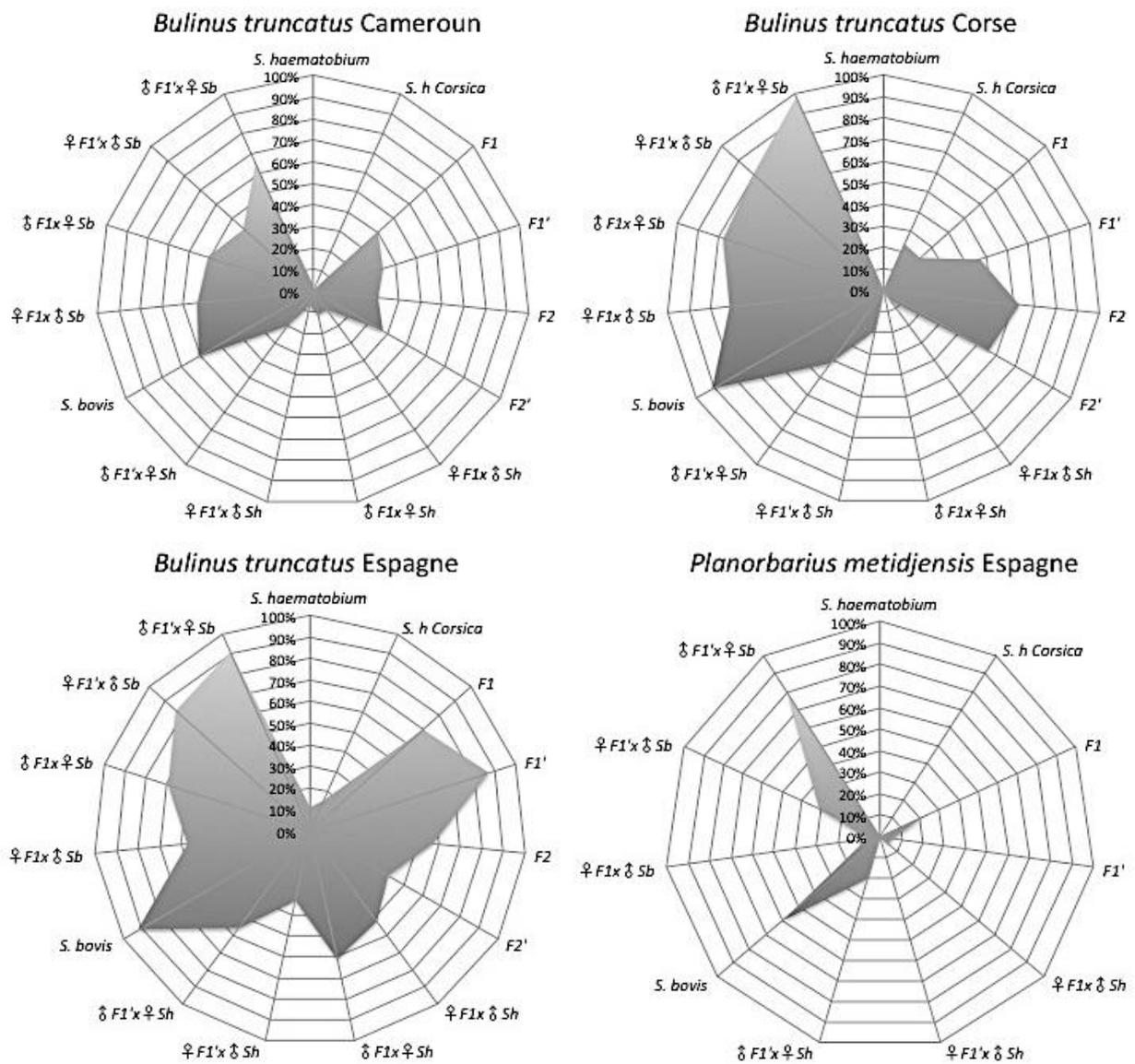


Figure 10 : Graphique radar représentant la susceptibilité de 4 souches de mollusques à l'infection par des schistosomes purs ou hybrides. Les prévalences sont mesurées 35 jours après expositions des mollusques avec 5 *miracidia*.

(i) Concernant les souches de mollusques, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à leur susceptibilité indépendamment des lignées de parasites. Nous avons sommé pour chaque souche de mollusque le nombre d'individus sains et le nombre d'individus infectés (Tableau 6).

Tableau 6 : Nombre total d'individus sains ou infectés pour chaque souche de mollusque sans considérer les lignées de parasites.

		Statut		Total
		Sains	Infectés	
Mollusques	<i>P. metidjensis</i> Espagne	148 (80%)	36 (20%)	184
	<i>B. truncatus</i> Cameroun	478 (68%)	221 (32%)	699
	<i>B. truncatus</i> Corse	401 (55%)	333 (45%)	734
	<i>B. truncatus</i> Espagne	394 (52%)	361 (48%)	755

Les souches de mollusques présentaient des différences significatives de susceptibilités aux parasites ($\chi^2=80,44$, ddl 3, $p < 0,001$). Les tests exacts de Fisher ont permis de mettre en évidence un effet souche. *P. metidjensis* d'Espagne était la souche la moins susceptible (20% des mollusques infecté) en comparaison avec *B. truncatus* Cameroun (32% ; $p < 0,001$), *B. truncatus* Corse (45% ; $p < 0,001$) et *B. truncatus* Espagne (48% ; $p < 0,001$). La souche de mollusque de *B. truncatus* Cameroun était également moins susceptible que *B. truncatus* Corse ($p < 0,001$) et *B. truncatus* Espagne ($p < 0,001$). En revanche les deux souches les plus susceptibles (*B. truncatus* Corse et *B. truncatus* Espagne) sont équivalentes face aux parasites ($p = 0,35$).

(ii) Nous avons ensuite comparé les prévalences des deux lignées parentales de parasites pour chaque souche de mollusques (Tableau 7).

Tableau 7: Prévalences associées à l'infection des souches de mollusques par les lignées parentales.

Mollusques	<i>S. bovis</i>	<i>S. haematobium</i>	P-value des tests exacts de Fischer
<i>P. metidjensis</i> Espagne	9/15 (60%)	0/24 (0%)	$p = 0,001$
<i>B. truncatus</i> Cameroun	14/23 (61%)	2/60 (3%)	$p = 0,001$
<i>B. truncatus</i> Corse	52/57 (91%)	0/16 (0%)	$p = 0,001$
<i>B. truncatus</i> Espagne	22/24 (92%)	24/221 (11%)	$p = 0,001$

Quelle que soit la souche de mollusque, *S. bovis* est plus performant que *S. haematobium*. En effet, *S. bovis* était capable d'infecter la totalité des souches de mollusques avec des prévalences supérieures à *S. haematobium*, situées entre 60% pour *P. metidjensis* et 92% pour *B. truncatus* d'Espagne (**Tableau 7, Figure 10**). *S. haematobium* était compatible seulement avec deux des quatre souches de mollusques étudiées, notamment *B. truncatus* du Cameroun (3%) et d'Espagne (11%) (**Figure 10**).

(iii) Nous avons ensuite comparé l'hybride naturel Corse avec les deux espèces parentales (**Tableau 8**). Ce parasite se comporte dans la plupart des cas comme *S. haematobium*.

Tableau 8 : Prévalences associées à l'infection des souches de mollusques par la souche hybride Corse.

Mollusques	Souche hybride Corse
<i>P. metidjensis</i> Espagne	0/29 (0%)
<i>B. truncatus</i> Cameroun	0/31 (0%)
<i>B. truncatus</i> Corse	9/37 (24%)
<i>B. truncatus</i> Espagne	5/34 (92%)

Il a une phase prépatente tardive, un spectre d'hôtes réduit (2 souches de mollusques sur 4 infectées) et des prévalences faibles par rapport à *S. bovis*. Concernant son interaction avec *Bulinus* Cameroun (0/31 ; 0%), la souche hybride Corse ne présentait pas de différence notable de prévalence avec *S. haematobium* ($p = 0,54$) mais une différence significative avec *S. bovis* ($p = <0,001$). Concernant la souche de *Bulinus* Corse (9/37; 24%) une différence significative a été trouvée avec *S. haematobium* ($p = 0,043$) et *S. bovis* ($p < 0,001$). Concernant la souche de *Bulinus* d'Espagne, il n'y avait pas de différence entre l'hybride Corse (5/34; 15%) et *S. haematobium* ($p = 0,55$) mais avec *S. bovis* ($p < 0,001$). Enfin concernant la capacité de l'hybride Corse à infester l'hôte de *S. bovis* (*Planorbarius metidjensis*), aucun mollusque n'a été infesté (0/29 ; 0%) et il n'y avait pas de différence significative avec *S. haematobium* ($p = 1$). En revanche il y en avait une avec *S. bovis* ($p < 0,001$).

(iv) Les hybrides de première génération ont ensuite été comparés aux lignées parentales (**Tableau 9**). Les hybrides réciproques de première génération (F1 et F1') ont maintenu la capacité de *S. bovis* à infester la totalité des souches de mollusques avec des prévalences intermédiaires entre les deux parents (**Tableau 9, Figure 10**).

Tableau 9 : Comparaison des prévalences associées aux lignées parentales et hybrides de première génération en fonction de la souche de mollusque. (*) Différence significative entre la souche parentale *S. haematobium* ou *S. bovis* et l'hybride de première génération F1. (+) Différence significative entre la souche parentale *S. haematobium* ou *S. bovis* et l'hybride de première génération F1'.

Mollusques	F1	F1'	<i>S. bovis</i>	<i>S. haematobium</i>
<i>P. metidjensis</i> Espagne	8/33 (24%)	1/18 (6%)	(60%)*+	(0%)*
<i>B. truncatus</i> Cameroun	49/121 (41%)	36/107 (34%)	(61%)+	(3%)*+
<i>B. truncatus</i> Corse	27/115 (24%)	64/137 (47%)	(91%)*+	(0%)*+
<i>B. truncatus</i> Espagne	44/63 (70%)	59/68 (87%)	(92%)*	(11%)*+

(v) Pour finir nous avons comparé de manière globale les prévalences des lignées hybrides rétrocroisées aux lignées parentales pour *S. haematobium* (Tableau 10) ou *S. bovis* (Tableau 11). Pour cela nous avons sommé les prévalences des hybrides issus de rétrocroisements avec *S. haematobium* ou avec *S. bovis*, respectivement. Concernant la comparaison entre *S. haematobium* pur et les lignées hybrides rétrocroisées avec cette même espèce parentale, nous pouvons noter que les hybrides présentent des niveaux de prévalence supérieurs à *S. haematobium* pour les souches *B. truncatus* (Cameroun) et *B. truncatus* (Corse). Même si certaines prévalences ne présentent pas de différences significatives en raison probablement d'un trop faible nombre de mollusques testés, notons que les 4 souches de mollusques sont sensibles aux lignées rétrocroisées.

Tableau 10 : Comparaison des prévalences associées aux lignées hybrides rétrocroisées avec *S. haematobium* et la lignée parentale *S. haematobium* pour chaque souche de mollusque. *Correspond au prévalences sommées des lignées ♀ F1 x ♂ Sh, ♂ F1 x ♀ Sh, ♀ F1'x ♂ Sh et ♂ F1' x ♀ Sh.

Mollusques	Lignées hybrides rétrocroisés avec <i>S. haematobium</i> *	<i>S. haematobium</i>	P-value des tests exact de Fisher
<i>P. metidjensis</i> Espagne	2/50 (4%)	0/24 (0%)	$p = 1$
<i>B. truncatus</i> Cameroun	19/150 (13%)	2/60 (3%)	$p = 0,04$
<i>B. truncatus</i> Corse	28/171 (16%)	0/16 (0%)	$p = 0,13$
<i>B. truncatus</i> Espagne	80/164 (49%)	24/221 (11%)	$p < 0,001$

Concernant la comparaison entre *S. bovis* pur et les lignées hybrides rétrocroisées avec cette même espèce parentale nous ne notons aucune différence significative (**Tableau 10**). Si nous faisons le lien avec la meilleure capacité de *S. bovis* par rapport aux hybrides de première génération (**Tableau 11**), cela signifierait que le rétrocroisement de ces hybrides avec *S. bovis* leur permettrait un gain d'infectivité et serait donc bénéfique au parasite.

Tableau 11 : Comparaison des prévalences associées aux lignées hybrides rétrocroisées avec *S. bovis* et la lignée parentale *S. bovis* pour chaque souche de mollusque. * Correspond aux prévalences sommées des lignées ♀ F1 x ♂ Sb, ♂ F1 x ♀ Sb, ♀ F1' x ♂ Sb et ♂ F1' x ♀ Sb.

Mollusques	Lignées hybrides rétrocroisé avec <i>S. bovis</i> *	<i>S. bovis</i>	P-value des tests exacts de Fisher
<i>P. metidjensis</i> Espagne	28/44 (64%)	9/15 (60%)	$p = 1$
<i>B. truncatus</i> Cameroun	88/154 (57%)	14/23 (61%)	$p = 0,82$
<i>B. truncatus</i> Corse	121/147 (82%)	52/57 (91%)	$p = 0,13$
<i>B. truncatus</i> Espagne	96/127 (76%)	22/24 (92%)	$p = 0,10$

(vi) Les lignées F2 et F2' montraient également de fortes prévalences sur les mollusques testés (**Figure 10**). Pour la F2 la prévalence était de 30% (9/30) pour *B. truncatus* du Cameroun ce qui n'est pas significativement différent de la F1 ($p = 0,40$). Elle était de 57% (16/28) pour *B. truncatus* Espagne, ce qui n'est pas non plus significativement différent de la F1 ($p = 0,33$), et de 63% (17/27) pour *B. truncatus* Corse ce qui est significativement supérieur à la F1 ($p = 0,0001$). Concernant le croisement F2' la prévalence était de 37% (11/30) pour *B. truncatus* (Cameroun) ce qui n'est pas significativement différent de la F1' ($p = 0,82$). La prévalence était de 42% (11/26) pour *B. truncatus* Espagne ce qui est significativement plus faible comparé à la F1' ($p < 0,001$) et de 56% (15/27) pour *B. truncatus* Corse ce qui n'est pas significativement différent de la F1' ($p = 0,40$). Ces résultats suggèrent que la vigueur hybride est conservée à la seconde génération et équivaut la plupart du temps aux hybrides de première génération.

Bilan du spectre d'hôtes intermédiaires des lignées de parasites

Sur les 15 lignées de parasites étudiées nous avons pu déterminer le spectre d'hôte (capacité à infecter *P. metidjensis*) de 11 d'entre elles (**Tableau 12**). Seule *S. haematobium*, l'hybride Corse et le rétrocroisement ♀ F1' x ♂ Sh n'étaient pas capable d'infecter ce mollusque.

Tableau 12 : Spectre d'hôte des lignées de parasites (capacité à infecter *P. metidjensis*).

Lignées	Capacité à infecter <i>P. metidjensis</i>
<i>S. haematobium</i>	Non
<i>S. bovis</i> ,	Oui
hybride Corse	Non
F1	Oui
F1'	Oui
♀ F1 x ♂ Sh	Oui
♀ F1' x ♂ Sh	Non
♂ F1' x ♀ Sh	Oui
♀ F1 x ♂ Sb	Oui
♀ F1' x ♂ Sb	Oui
♂ F1' x ♀ Sb	Oui

Interaction schistosomes-vertébré

d) Mortalité des hôtes

Tous les hamsters n'ont pas survécu jusqu'à la date de perfusion à 90 jours et certains, moribonds, ont dû être perfusés prématurément, démontrant la forte pathogénicité des hybrides. Au contraire aucun hamster infecté par les lignées pures n'a dû être perfusé prématurément. Notons que la combinaison la plus virulente (♀ F1' x ♂ Sb) a causé la mort de 4 hamsters sur 6 entre 60 et 67 jours après les infestations (**Tableau 13**). Ces résultats suggèrent également un temps de développement plus court des lignées hybrides comparées à leurs parents.

Tableau 13 : Mortalité induite des hôtes. Les lignées sont classées en fonction de la mortalité induite chez l'hôte. Les hamsters avec une date de perfusion précoce sont des animaux pour lesquels nous avons pu mesurer les traits de vie à l'inverse des animaux morts.

Lignées	Nombre d'animaux infestés	Nombre de morts	Hamsters perfusés précocement (Nb. de jours après l'infestation)
♀ F1' x ♂ Sb	6	4	2 (63-67 jours)
♂ F1' x ♀ Sh	6	3	1 (85 jours)
♂ F1 x ♀ Sb	6	2	1 (82 jours)
F1	7	2	1 (67 jours)
F1'	7	2	1 (81 jours)
♂ F1' x ♀ Sb	6	1	1 (80 jours)
♀ F1 x ♂ Sh	6	1	0
♀ F1' x ♂ Sh	6	0	1 (85 jours)

Nous pouvons voir dans la **Figure 11** que de nombreux couples de vers sont encore situés dans les veines mésentériques de leurs hôtes suite à la perfusion hépatique ce qui nécessite de procéder à leur dissection. Également nous pouvons voir un des effets de la pathologie induite sur les mésentères avec la formation de granulomes qui résultent d'une réaction immunitaire mise en place pour circonscrire et éliminer les œufs (**Figure 11**).

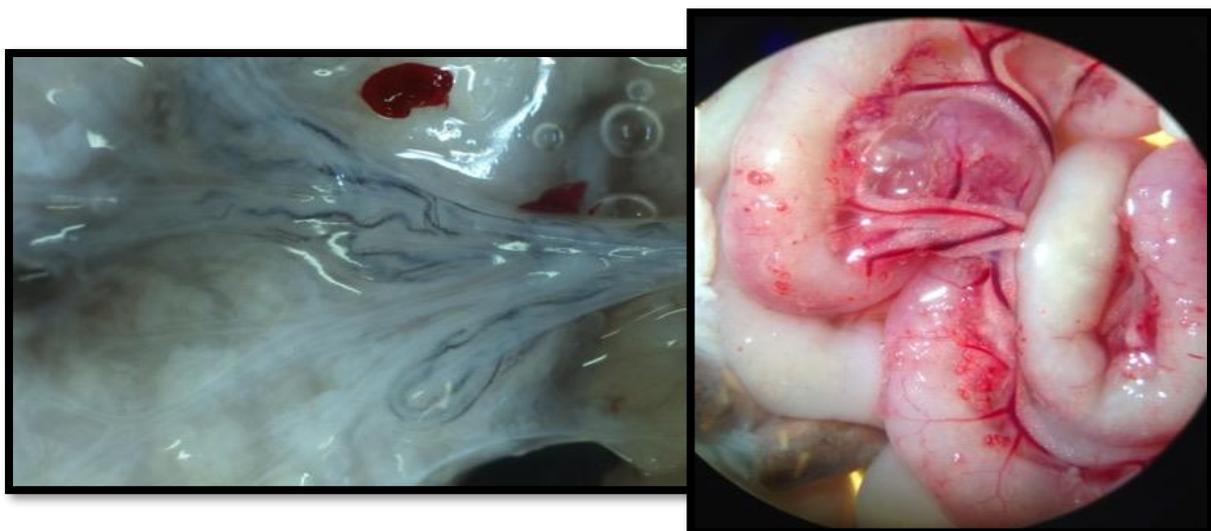


Figure 11 : Photographie des mésentères d'un hamster infecté par un hybride de première génération.

e) Infectivité des cercaires

En comptant le nombre de vers adultes récupérés suite à la perfusion hépatique et la dissection systématique des mésentères des hamsters, nous avons pu estimer la capacité des parasites à pénétrer et se développer chez cet hôte définitif de laboratoire (**Tableau 14**). L'infectivité des cercaires présentait des différences significatives entre les lignées pures et hybrides (KW = 30,085 ; $p = 0,003$). Cependant, en raison de la forte variabilité observée au sein de chaque lignée et de la mort précoce de nombreux hamsters diminuant la taille de l'échantillonnage, les comparaisons par paires effectuées (Tests de Dunn) n'ont pas permis de déterminer à quels niveaux ils étaient visibles. Quoiqu'il en soit l'infectivité moyenne des cercaires est systématiquement supérieure chez les hybrides comparés aux espèces parentales). Elle se situe entre 19% et 21% pour *S. bovis* et *S. haematobium*, respectivement et atteint 24% pour l'hybride Corse. L'infectivité des cercaires atteint 30% et 38% pour les hybrides de première génération **F1'** et **F1** respectivement. Cependant l'écart-type au sein de chaque combinaison pouvait être élevé (**Tableau 14**). L'infectivité des cercaires des lignées rétrocroisées est ensuite maintenue entre ces valeurs et oscille autour de 25% pour la combinaison ♀ **F1'** x ♂ **Sh** et 37% pour la combinaison ♂ **F1'** x ♀ **Sh**.

f) Prolificité des femelles

Nous avons estimé la prolificité moyenne des femelles par jour, en considérant que les premiers œufs sont produits à partir d'environ 30 jours après les infestations (30 à 37 jours chez *S. bovis*). Les différences de prolificité étaient significatives entre les lignées de parasites (KW : 41,348 ; $p < 0,001$) cependant les comparaisons par paires n'étaient pas significatives (Test de Dunn) ne nous permettant pas d'identifier précisément où se situent ces différences (**Tableau 14**). *S. bovis* semble plus prolifique que *S. haematobium* avec en moyenne 38 ± 8 œufs contre 21 ± 11 œufs pondus par jour et par femelle. La prolificité de l'hybride Corse est similaire à celle de *S. haematobium* avec 20 ± 4 œufs pondus par jour et par femelle (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Synthèse des résultats de traits d'histoire de vie mesurés entre espèces parentales et hybrides

Paramètres (Nb. de hamsters)	<i>S. bovis</i> (n = 6)	<i>S. haematobium</i> (n = 6)	F1 (n = 5)	F1' (n = 5)	Hybride Corse (n = 6)	♀ F1 x ♂ Sh (n = 5)	♂ F1 x ♀ Sh (n = 5)	♀ F1 x ♂ Sb (n = 6)
Infectivité des cercaires	111 ± 40 (19%)	129 ± 17 (21%)	207 ± 195 (38%)	162 ± 63 (30%)	142 ± 27 (24%)	191 ± 26 (32%)	196 ± 40 (33%)	213 ± 28 (36%)
Splénomégalie	0,0024 ± 0,0006	0,0016 ± 0,0003	0,0041 ± 0,0006	0,0041 ± 0,0028	0,0021 ± 0,0004	0,0023 ± 0,0003	0,0023 ± 0,0003	0,0024 ± 0,0006
Hépatomégalie	0,044 ± 0,002	0,044 ± 0,0052	0,047 ± 0,007	0,051 ± 0,010	0,0473 ± 0,0049	0,0508 C 0,0030	0,0455 ± 0,0030	0,0521 ± 0,0053
Nb d'œufs /jour /femelle	38 ± 8	21 ± 11	110 ± 124	17 ± 8	20 ± 4	44 ± 12	17 ± 8	45 ± 4

Tableau 14 (suite) : Synthèse des résultats de traits d'histoire de vie mesurés entre espèces parentales et hybrides

Paramètres (Nb. de hamsters)	♂ F1 x ♀ Sb (n = 4)	♀ F1' x ♂ Sh (n = 5)	♂ F1' x ♀ Sh (n = 3)	♀ F1' x ♂ Sb (n = 2)	♂ F1' x ♀ Sb (n = 5)	Hamster sain (n = 6)
Infectivité des cercaires	201 ± 63 (33%)	151 ± 8 (25%)	222 ± 32 (37%)	200 ± 17 (33%)	197 ± 47 (33%)	-
Splénomégalie	0,0037 ± 0,0004	0,0014 ± 0,0003	0,0059 ± 0,0009	0,0015 ± 0,0004	0,0029 ± 0,0007	0,0011 ± 0,0001
Hépatomégalie	0,0608 ± 0,0073	0,0403 ± 0,0039	0,0688 ± 0,0121	0,0359 ± 0,0057	0,0540 ± 0,0063	0,038 ± 0,003
Nb d'œufs /jour /femelle	52 ± 19	43 ± 27	60 ± 15	172 ± 35	40 ± 10	-

Une asymétrie était visible entre les femelles F1 et F1' qui pondent en moyenne 110 ± 124 , et 17 ± 8 œufs par jour, respectivement. Concernant les lignées issues de rétrocroisements, une augmentation de la prolificité est généralement observée sauf pour les femelles de la combinaison ♂ **F1** x ♀ **Sh** qui pondent en moyenne 17 ± 8 œufs par jour. Le reste des femelles hybrides issues des rétrocroisements pondent entre 40 ± 10 œufs par jour pour la combinaison ♂ **F1'** x ♀ **Sb** et 172 ± 35 pour la combinaison ♀ **F1'** x ♂ **Sb**, ce qui est au minimum deux fois plus que les espèces parentales (**Tableau 14**).

- Pathologie induite

Le niveau d'infectivité et la prolificité des femelles ont un effet sur la pathologie induite. Nous avons analysé cette pathologie en nous focalisant sur une surcroissance de la rate (splénomégalie) et du foie (hépatomégalie).

Dans notre étude le ratio entre le poids de la rate et le poids total d'un hamster sain était de $0,0011 \pm 0,0001$. On s'attendait a priori à avoir une augmentation de ce ratio suite à l'infection (**Tableau 14 et Figure 12**), et en effet ce ratio présentait des différences significatives en fonctions des lignées de parasites ($KW = 55,304$; $p = 0,0001$). Les différences ont été observées entre les hamsters sains et certaines lignées hybrides, notamment la **F1** ($0,0041 \pm 0,0006$; $p = 0,001$), la **F1'** ($0,0041 \pm 0,0028$; $p = 0,005$), et les rétrocroisements : ♂ **F1'** x ♀ **Sb** ($0,0029 \pm 0,0007$; $p = 0,049$), ♂ **F1** x ♀ **Sb** ($0,0037 \pm 0,0004$; $p = 0,004$) et ♂ **F1'** x ♀ **Sh** ($0,0059 \pm 0,0009$; $p = 0,001$).

D'autres différences significatives étaient observables entre lignées hybrides, et plus particulièrement entre la lignée ♀ **F1'** x ♂ **Sh** et les **F1** ($p = 0,001$) ou entre la lignée ♀ **F1'** x ♂ **Sh**, et ♂ **F1'** x ♀ **Sh** ($p = 0,013$). Ceci a permis de mettre en évidence que ces combinaisons sont virulentes et provoquent une pathologie accrue chez l'hôte. Cependant la splénomégalie n'était pas systématiquement observable lors de l'infection et ceci de façon surprenante, en particulier pour la lignée de parasite qui semblait la plus pathogène ♂ **F1'** x ♀ **Sh** (**Tableau 14 et Figure 12**).

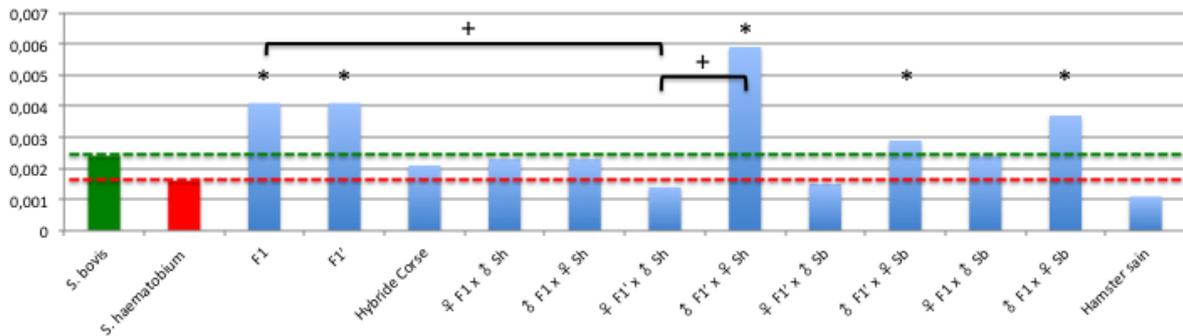


Figure 12 : Représentation graphique des mesures de splénomégalie. (*) Différences significatives avec les hamsters sains, (+) différences significatives entre hybrides. Les pointillés en rouge correspondent à la moyenne observée chez *S. haematobium* tandis que ceux en vert correspondent à la moyenne observée chez *S. bovis*.

Concernant l'hépatomégalie, le ratio entre le poids du foie et le poids total d'un hamster sain était de $0,038 \pm 0,003$ en moyenne. Ce ratio présentait également des différences significatives en fonction des lignées de parasites ($KW = 47,618$; $p = 0,0001$). Ces différences étaient observables en comparant les hamsters sains et les lignées rétrocroisées ♂ **F1** x ♀ **Sb** ($0,0608 \pm 0,0073$; $p = 0,007$), ou ♂ **F1'** x ♀ **Sh** ($0,0688 \pm 0,0121$; $p = 0,009$).

Les comparaisons entre lignées hybrides ont permis de déterminer que les combinaisons ♀ **F1'** x ♂ **Sb** ($0,0359 \pm 0,0057$) et ♀ **F1'** x ♂ **Sh** ($0,0403 \pm 0,0039$) ne présentaient pas de différences avec les hamsters sains, mais avec les lignées ♂ **F1** x ♀ **Sb** ($p = 0,012$; $p = 0,037$) et ♂ **F1'** x ♀ **Sh** ($p = 0,014$; $0,044$) qui induisent toutes les deux une importante hépatomégalie chez les hamsters (**Tableau 14 et Figure 13**).

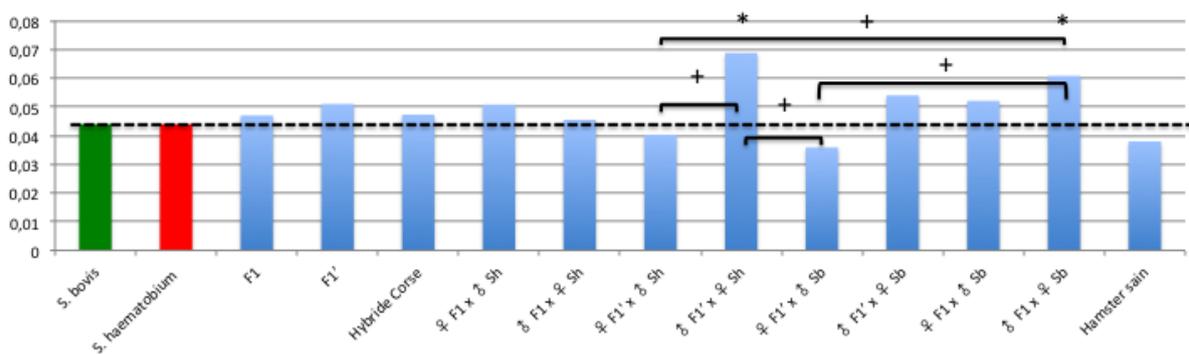


Figure 13 : Représentation graphique des mesures de l'hépatomégalie. (*) Différences significatives avec les hamsters sains, (+) Différences significatives entre hybrides. Les pointillés en noir correspondent à la moyenne observée chez *S. haematobium* et *S. bovis*.

g) Morphologie des œufs

Pour finir nous avons analysé la morphologie des œufs issus de parents et de lignées rétrocroisés. Au moins 30 œufs ont été utilisés pour mesurer la longueur (incluant l'éperon), la largeur, la taille de l'éperon lorsqu'il était visible et la surface totale des œufs (**Tableau 15**). Dans un premier temps nous avons effectué une analyse discriminante sur 3 des variables mesurées (la longueur, la largeur et la taille de l'éperon de chaque œuf) afin d'identifier un potentiel patron en fonction des espèces parentales et des lignées hybrides (**Figure 14**).

Tableau 15 : Mesures de la morphologie des œufs issus des espèces parentales et des lignées hybrides.

	Longueur (µm) [min-max]	Largeur (µm) [min-max]	Taille de l'éperon (µm) [min-max]	Surface (µm ²) [min-max]
<i>S. bovis</i> (n=33)	189,7 ± 15,6 [160,6-227,4]	52,3 ± 8,8 [39,5-81,9]	12,3 ± 3,8 [3,5-19,7]	5453,0 ± 1256,7 [4053,6 -9745,9]
<i>S. haematobium</i> (n=36)	129,4 ± 15,7 [90,9-158,5]	61,5 ± 7,8 [40,9-75,2]	9,2 ± 3,4 [1,8-15,8]	5384,2 ± 1029,9 [3076,4-7696,6]
F1 (n=34)	171,9 ± 19,1 [133,0-210,2]	55,2 ± 10,8 [34,5-77,8]	10,9 ± 1,6 [7,3-13,7]	5568,2 ± 1497,4 [3321,0-8382,2]
F1' (n=32)	160,71 ± 10,3 [132,9-184,1]	56,3 ± 7,4 [39,2-72,9]	9,3 ± 1,3 [6,2-12,4]	5494,0 ± 980,6 [3174,0-8134,4]
Hybride Corse (n=36)	126,4 ± 22,9 [73,9-170,9]	60,8 ± 13,0 [40,9-92,5]	8,2 ± 2,1 [3,95-13,6]	5401,2 ± 2052,0 [2652,2-10880,2]
♀ F1 x ♂ Sh (n=32)	181,2 ± 21,3 [129,5-217,6]	67,1 ± 6,3 [52,8-84,1]	11,7 ± 3,4 [3,2-17,9]	7397,1 ± 761,5 [5974,9-9208,0]
♂ F1 x ♀ Sh (n=36)	190,2 ± 26,3 [100,4-224,3]	70,6 ± 9,6 [43,4-94,1]	13,4 ± 2,8 [6,3-19,2]	8356,8 ± 1733,6 [2807,1-12871,3]
♀ F1 x ♂ Sb (n=34)	226,3 ± 24,1 [183,9- 274,7]	74,6 ± 7,1 [63,0-88,2]	14,0 ± 5,3 [3,3-28,1]	9531,8 ± 1695,3 [7244,9-13535,8]
♂ F1 x ♀ Sb (n=34)	208,5 ± 20,6 [154,9-239,1]	83,9 ± 12,1 [60,8-113,8]	10,4 ± 1,7 [7,4-13,9]	10405,3 ± 2224,3 [7117,4-16788,1]
♀ F1'x ♂ Sh (n=32)	142,5 ± 13,5 [114,5-173,4]	50,0 ± 5,1 [44,1-63,4]	10,6 ± 1,8 [7,5-14,0]	4416,9 ± 725,1 [3534,2-6189,9]
♂ F1' x ♀ Sh (n=37)	221,9 ± 28,3 [181,5-287,7]	75,7 ± 8,5 [54,3-87,8]	12,5 ± 2,6 [8,9-19,3]	10131,1 ± 1711,6 [6975,6-13413,4]
♀ F1' x ♂ Sb (n=36)	240,6 ± 20,3 [205,2 – 293,0]	95,5 ± 2,1 [75,8-127,0]	12,6 ± 1,4 [9,1-15,4]	12751,8 ± 1307,3 [9227,9-19315,9]
♂ F1' x ♀ Sb (n=30)	203,9 ± 17,3 [177,6-243,9]	73,3 ± 9,5 [57,6-94,1]	10,9 ± 3,5 [6,6-21,1]	8665,1 ± 1548,5 [6784,7-13156,4]

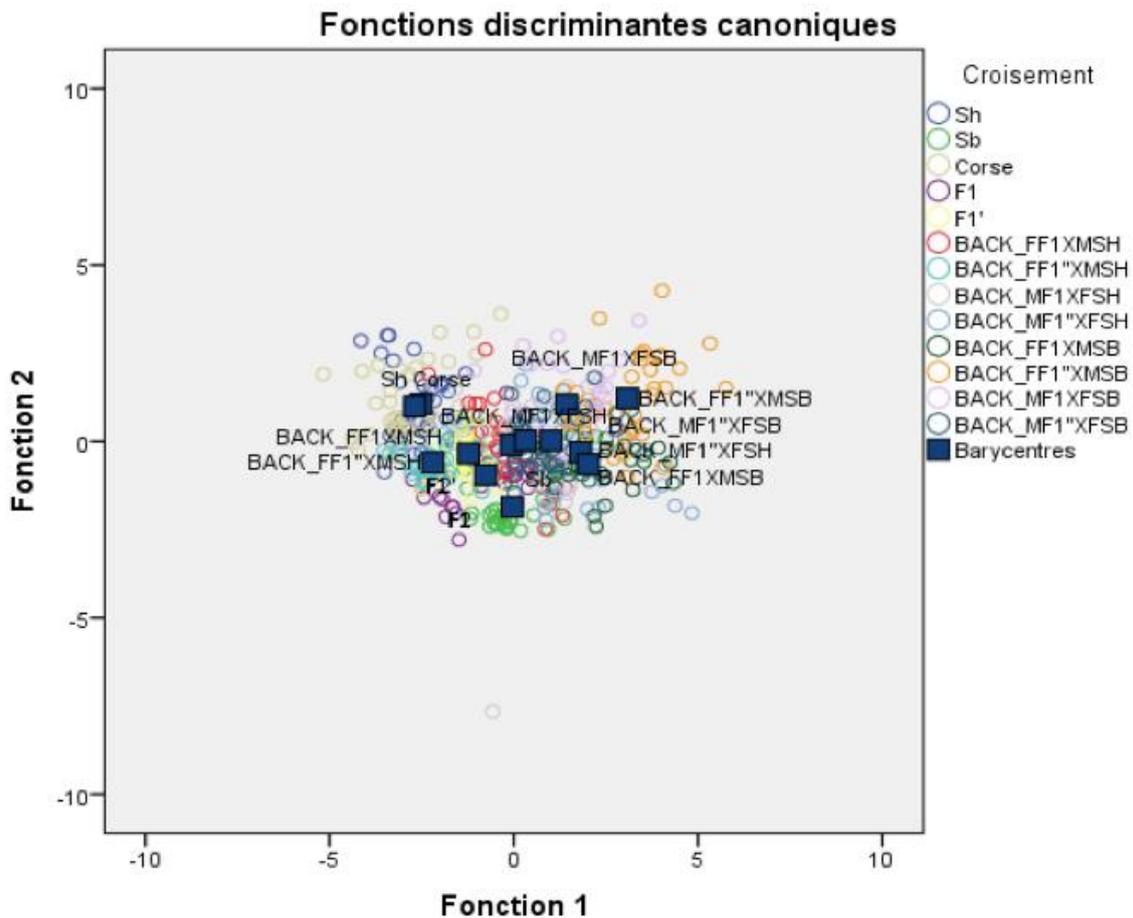


Figure 14 : Analyse discriminante de la morphologie des œufs issus des espèces parentales et des lignées hybrides. Nous avons considéré dans l'analyse la longueur, largeur et la taille de l'éperon des œufs. Le pourcentage de la variance expliquée est de 79,2 % pour l'axe 1 (fonction 1) et de 19,1% pour l'axe 2 (fonction 2).

Aucun patron permettant de distinguer les hybrides des parents n'ont pu être mis en évidence (**Figure 14**).

Nous nous sommes ensuite focalisés sur la surface des œufs ce qui permet de synthétiser la longueur et la largeur des œufs en une seule variable. Nous avons pu mettre en évidence des différences significatives de taille en fonction des lignées pures et hybrides ($F = 82,534$ $p < 0,0001$). Les tailles des œufs des espèces parentales ne diffèrent pas entre elles ($p = 1$) ni par rapport aux œufs de l'hybride naturel Corse ($p = 1$) ou des œufs issus des lignées de première génération F1 ($p = 1$) et F1' ($p = 1$). En revanche on observe presque systématiquement une augmentation de la taille des œufs issus des lignées rétrocroisées par rapport à ces dernières lignées (Espèces parentales, Corse, F1 et F1') et ceci peut avoir d'importantes conséquences sur la pathologie induite à l'hôte comme nous avons pu le voir

ci-dessus. En comparaison avec les œufs de *S. haematobium* seul le rétrocroisement ♀ **F1'** x ♂ **Sh** ne présentait pas de différences dans la taille des œufs produits ($p = 0,826$). Tous les autres rétrocroisements produisaient des œufs significativement plus gros (♀ **F1** x ♂ **Sh** : $p = 0,018$ et autres rétrocroisements : $p < 0,0001$). De façon similaire, les œufs de *S. bovis* n'étaient pas différents du rétrocroisement ♀ **F1'** x ♂ **Sh** ($p = 0,780$) mais étaient plus petits que tous les autres rétrocroisements (♀ **F1** x ♂ **Sh** : $p = 0,040$; et autres rétrocroisements : $p < 0,0001$). Tandis que la lignée ♀ **F1'** x ♂ **Sh** produisait les œufs les plus petits parmi les parasites rétrocroisés ($p < 0,001$), c'est le rétrocroisement ♀ **F1'** x ♂ **Sb** qui produisait les œufs les plus gros que toutes les autres lignées de parasite ($p < 0,001$) pouvant atteindre 12 751 μm^2 de surface comparé à près de 5 000 μm^2 pour les œufs des espèces parentales. Ceci met en évidence que ce dernier croisement constitue donc potentiellement la lignée de parasites la plus apte à induire une forte pathologie à l'hôte.

Cette analyse confirme que la morphologie des œufs ne permet pas de discriminer le caractère « pur » ou « hybride » du parasite, ce qui constitue un potentiel problème pour le diagnostic parasitologique. Des photographies de la morphologie des œufs sont présentées en **Annexe 2**.

Discussion

S. haematobium et *S. bovis* ont une forte capacité à s'hybrider (Taylor 1970; Pages & Théron 1990; Bremond et al. 1993; Huyse et al. 2009; Webster et al. 2013; Boissier et al. 2016; Kincaid-Smith et al. 2018). On a pu observer que l'hybridation s'effectue de façon bidirectionnelle (Moné et al. 2015; Huyse et al. 2009), et certains auteurs ont précisé que le croisement qui semble le plus prévalent sur le terrain correspond à un croisement initial entre un mâle *S. haematobium* et une femelle *S. bovis*, (ce qui correspond à nos F1') menant à l'introgession d'ADN mitochondrial de *S. bovis* dans *S. haematobium* (Huyse et al. 2009). De façon intéressante la souche émergente en Corse est vraisemblablement issue de ce même croisement initial (ITS de type *S. haematobium*; COI de type *S. bovis*) (Moné et al. 2015; Boissier et al. 2016). Huyse et al. (2009) ont proposé que le croisement inverse était potentiellement moins viable et moins performant en raison d'une plus forte compétitivité des mâles *S. haematobium* ou d'incompatibilités génomiques (Huyse et al. 2009). Les résultats de mon étude n'indiquent pas d'incompatibilités notables sous-jacentes à une

moins bonne viabilité de ce croisement mais ces observations peuvent être différentes de la réalité du terrain en fonction des hôtes définitifs et intermédiaires utilisés par le parasite. Tandis que les hybrides de première génération partagent 50% du matériel génétique de chacun des deux parents (mais différent par rapport à l'origine maternelle ou paternelle des allèles hérités), les rétrocroisements ont permis d'introgresser différenciellement le génome des hybrides. Ils sont composés de 75% du matériel génétique de *S. bovis* ou *S. haematobium* et 25% du génome de l'autre espèce réciproquement. Ce niveau d'introggression est comparable avec celui de la souche Corse (77% *S. haematobium* vs. 23% *S. bovis* (Kincaid-Smith et al. 2018)) pour le rétrocroisement avec *S. haematobium*.

1) Interaction schistosomes-mollusques

Influence de la souche de mollusque

Nous avons dans un premier montré, indépendamment de la lignée de parasites utilisée, qu'il y avait un effet de souche important au niveau des mollusques qui présentaient des niveaux de susceptibilités différents aux parasites. Notre souche de *Planorbarius* d'Espagne est la moins susceptible suivie de la souche de *Bulinus* du Cameroun. En revanche les souches de *Bulinus* de Corse et d'Espagne présentaient les taux de mollusques infestés les plus importants ce qui suggère i) que l'émergence en Corse n'est peut être pas seulement fortuite, et que, ii) ces deux localités présentent un risque relativement important pour l'endémicité de la schistosomiase en Europe. Fait intéressant, un cas inhabituel de schistosomiase urogénitale a été observé chez un patient espagnol n'ayant jamais séjourné dans une région endémique, ce qui signifie que des cas sporadiques de schistosomiase peuvent survenir en Espagne ou au Portugal (Calvo-Cano et al. 2015) et sont potentiellement liés à la forte susceptibilité des mollusques présents. De plus l'abondance des mollusques nécessaires à la transmission du parasite et l'intensification des flux migratoires en Espagne doivent alerter la communauté scientifique et les autorités sanitaires de la possibilité d'apparition de cas autochtones dans ce pays (Villasante Ferrer et al. 2018).

Focus sur les espèces parentales

Les deux espèces parentales présentent des phénotypes contrastés en ce qui concerne leur interaction avec l'hôte intermédiaire. Des différences notables ont été mises en évidence pour la phase prépatente, le spectre d'hôte mais aussi les niveaux de prévalences associés aux parasites.

- Durée de la phase prépatente

Dans ce travail nous avons mis en évidence que *S. haematobium* présente un temps de développement plus tardif (phase prépatente d'au moins 28 jours) comparativement à *S. bovis* (phase prépatente d'au moins 20 jours). Des résultats similaires ont été trouvés dans d'autres études qui mettent en évidence pour *S. haematobium* une phase prépatente de 30 à 40 jours selon l'association hôte-parasite (Njiokou et al. 2004) voire au delà de 50 jours (Moukrim et al. 1995). En revanche la durée de la phase prépatente chez *S. bovis* se situe généralement entre 21 et 28 jours (Mutani et al. 1983). Cette différence de temps de développement au sein des mollusques concorde avec nos résultats. De façon intéressante, des études ont montré pour *S. bovis* que la période prépatente était fonction de la température. Le temps de développement du parasite est réduit lorsque les températures augmentent (24 et 21 jours pour *B. truncatus* à 24°C, et 26°C, respectivement contre 27 et 22 jours pour *P. metidjensis* à 24°C et 26°C, respectivement) (Touassem & Jourdan 1986).

- Spectre d'hôtes

Nous avons vu que *S. haematobium* a un spectre d'hôtes intermédiaires réduit (deux des quatre souches de mollusques peuvent transmettre *S. haematobium* contre quatre pour *S. bovis*). Au contraire, comme cela a été mis en évidence par le passé, *S. bovis* a un large spectre d'hôtes (Mutani et al. 1983; Moné et al. 1999). Nos analyses de la compatibilité entre *S. haematobium* et *P. metidjensis* (Espagne) ont confirmé certaines observations selon lesquelles les schistosomes africains ne sont pas capables d'infecter et de se développer chez ces mollusques (Xavier 1965; Southgate et al. 1983; Simoes and Medeiros 1980), contrairement aux associations sympatriques africaines de *P. metidjensis* et *S. haematobium*

(voir (Kincaid-Smith et al. 2017) pour une synthèse) (Moukrim et al. 1995; Moukrim et al. 1996; Zekhnini et al. 1997; Yacoubi et al. 1999; Zekhnini et al. 2002)

- Prévalences

Les prévalences de *S. haematobium* sont systématiquement plus faibles que celles de *S. bovis*. Elles se situent entre 3% (*Bulinus* Cameroun) et 11% (*Bulinus* Espagne) pour *S. haematobium* alors que les mollusques Corses et l'hôte naturel de *S. bovis* (*P. metidjensis*) ne sont pas susceptibles au parasite. Le plus faible niveau de prévalence observé pour *S. bovis* était de 60% pour *P. metidjensis* et pouvait atteindre 92% pour *B. truncatus* d'Espagne. Des études comparant la compatibilité entre *S. bovis* du Soudan et d'Espagne avec ses deux hôtes, *B. truncatus* (Tunisie) et *P. metidjensis* (Maroc), ont montré que la prévalence de *S. bovis* (Espagne) était généralement élevée et variait de 61% à 45% pour et *B. truncatus* et *P. metidjensis*, respectivement (Touassem & Jourdane 1986). En revanche il ne semble pas y avoir de lien entre la distance géographique et les niveaux de compatibilité au sein de l'interaction mollusque-schistosomes (Kincaid-Smith et al. 2017). Des études sur la compatibilité entre différentes souches de *S. haematobium* et *B. truncatus* issus de différentes localités (interactions sympatriques et allopatriques) montrent des résultats contrastés. En effet, certains auteurs trouvent des niveaux élevés de compatibilité entre *B. truncatus* et *S. haematobium* dans un contexte allopatrique (la souche algérienne de *S. haematobium* peut infecter 52,6% des *B. truncatus* de Corse) (Capron et al. 1965). Les souches de *S. haematobium* de Guinée et du Mozambique peuvent également infecter les *B. truncatus* du continent européen (Algarve, Portugal) à des taux élevés (35% pour *S. haematobium* de Guinée et 30% pour *S. haematobium* du Mozambique) (Silva et al. 1974) ce qui pourrait être comparable à notre souche espagnole de *B. truncatus*, compte tenu de la proximité géographique. D'autres auteurs ont montré que les prévalences entre *S. haematobium* et *B. truncatus* Cameroun (de différentes localités), lorsqu'elle est susceptible, varient entre 11% et 74% (Njiokou et al. 2004).

Impact de l'hybridation sur le compartiment mollusque

- Hybride naturel Corse

L'hybride Corse semble fortement similaire en termes de traits d'histoire de vie à une souche « classique » de *S. haematobium*. Le temps de prépatence, le spectre d'hôte et les niveaux de prévalences associées sont semblables à cette espèce. Une différence notable cependant est que cet hybride est compatible avec les *Bulinus truncatus* présents en Corse ce qui pourrait être une des capacités acquise grâce aux gènes de *S. bovis* présents dans son génome mais nécessite d'être investigué (Kincaid-Smith et al. 2018). Plusieurs éléments importants pour l'épidémiologie de ce parasite ressortent de cette analyse. Les risques de transmission dans les zones où *P. metidjensis* est présent devraient être amoindris même si cela doit être nuancé en vue de l'absence de lien entre la distance géographique et les niveaux de compatibilité (Kincaid-Smith et al. 2017). Cela signifie aussi que 23% de gènes de *S. bovis* (Kincaid-Smith et al. 2018) présents dans cet hybride ne permettent pas a priori l'élargissement du spectre d'hôte du parasite pour un mollusque de genre différent (*P. metidjensis*), sans doute à cause des nombreux rétrocroisements effectués avec *S. haematobium*.

- Hybrides de première génération

Les hybrides de première génération présentent en général de la vigueur comparativement à l'espèce parentale *S. haematobium*. Cependant les phénotypes sont intermédiaires entre les deux espèces parentales. Premièrement, la durée de la phase prépatente est fonction du sens du croisement et suit celle de l'espèce maternelle. Elle est de 28 jours pour la F1 (♀ Sh x ♂ Sb) et de 20 jours pour la F1' (♂ Sh x ♀ Sb). Deuxièmement, le spectre d'hôtes est élargi et les hybrides sont capables d'infester les deux genres de mollusques spécifiques des espèces parentales. Cet élargissement du spectre d'hôtes chez les hybrides a été mis en évidence au sein d'autres études à l'échelle de i) la souche (*Bulinus truncatus* sympatrique vs. allopatrique) (Huyse et al. 2009)), ii) de l'espèce ((*Bulinus forskalii* et *Bulinus truncatus*) (B L Webster & Southgate 2003)) et, iii) dans notre cas à l'échelle du genre (*Bulinus* et *Planorbarius*).

- Lignées hybrides rétrocroisées

Pour plus de simplicité nous considérons ici deux cas de figure : le rétrocroisement des lignées hybrides de première génération avec i) *S. haematobium*, ou ii) *S. bovis*. Dans la première situation les lignées rétrocroisées avec *S. haematobium* sont généralement plus performantes que l'espèce pure. La durée de la phase prépatente correspond à celle de l'espèce parentale à l'origine du rétrocroisement mais les quatre souches de mollusques sont infestées et les niveaux de prévalence sont supérieurs à l'espèce pure.

Dans la seconde situation les lignées rétrocroisées avec *S. bovis* ont également une durée de la phase prépatente et un spectre d'hôtes correspondant à ceux de l'espèce parentale à l'origine du rétrocroisement. Nous pouvons observer une amélioration des capacités infectives (prévalences) par rapport aux hybrides de première génération et une forte similarité phénotypique avec *S. bovis* pur en terme de prévalences. Si nous faisons le lien avec la meilleure capacité de *S. bovis* par rapport aux hybrides de première génération (**Tableau 9**), cela signifierait que le rétrocroisement de ces hybrides avec *S. bovis* leur permettrait un gain d'infectivité et serait donc bénéfique au parasite.

- Lignées hybrides de seconde génération

Comme pour les F1, la durée de la phase prépatente est fonction du sens du croisement et suit celle de l'espèce maternelle. Les niveaux de prévalences comparativement aux hybrides de première génération sont maintenus à la hausse en F2 et F2' malgré la recombinaison.

Risques liés à l'hybridation pour le compartiment mollusque

Nos résultats suggèrent que les lignées hybrides issues du croisement entre *S. haematobium* et *S. bovis* ont des capacités invasives accrues par rapport à l'espèce infectant l'Homme, *S. haematobium*. En effet, en plus des niveaux de prévalences supérieurs, ces hybrides ont un plus large spectre d'hôtes ce qui augmente les zones à risque d'émergence de la schistosomiase en Afrique mais également en Europe où les hôtes sont présents. En effet, *B. truncatus* l'hôte de *S. haematobium* et *S. bovis* est endémique des îles méditerranéennes, et de plusieurs pays du sud de l'Europe (zones côtières atlantiques et méditerranéennes de la péninsule ibérique), notamment la France, le Portugal, l'Espagne, la Grèce, et l'Italie (Welter-Schultes 2012). Dans le sud de l'Espagne, *B. truncatus* a récemment été identifié

dans la province de Huelva (Gómez & Serna 2006) à Almeria et à Alicante (Martínez-Ortí et al. 2015) mais également dans le nord de l'Espagne, en Catalogne (Bech 1990) et dans les provinces de Galice (Rolán et al. 1987). En France, *B. truncatus* est abondamment présent en Corse (Doby et al. 1966) et a été observé dans le sud du continent, dans le piémont Pyrénéen et autour de Montpellier (Kincaid-Smith et al. 2017). *S. haematobium* pourrait donc théoriquement s'implanter sur ces zones si on considère uniquement la présence du mollusque comme facteur limitant. Nous savons également que *P. metidjensis* l'hôte de *S. bovis* est historiquement présent dans toute la péninsule ibérique (Espagne et Portugal) et est abondant dans le sud de l'Espagne, principalement dans la province de Huelva et à Almeria (Gómez & Serna 2006; Pérez-Quintero et al. 2004) mais n'a jamais été observé ailleurs en Europe (Welter-Schultes 2012). L'Europe est donc potentiellement une zone à risque et déterminer la capacité invasive des schistosomes sous nos latitudes est important. Ainsi, il serait donc nécessaire de déterminer la sensibilité des mollusques hôtes européens aux espèces de schistosomes de diverses origines géographiques afin d'établir des cartes de risque potentiel d'introduction du parasite (Kincaid-Smith et al. 2017).

2) Interaction schistosomes-vertébré

Infectivité des cercaires

De la vigueur hybride était également présente au niveau du compartiment vertébré du cycle de vie des parasites. En effet, nous avons pu voir que les cercaires hybrides avaient systématiquement une meilleure capacité à infecter et se développer chez l'hôte expérimental hamster comparé aux espèces parentales. Des études antérieures ont montré des résultats similaires. Les hybrides entre *S. haematobium* et *S. intercalatum* (Webster 2003; Wright et al. 1974) et entre *S. haematobium* et *S. mattheei* ont acquis une meilleure capacité à infecter les hôtes expérimentaux de laboratoire. Pour les croisements de *S. haematobium* x *S. intercalatum*, entre 41% et 66% des cercaires hybrides se sont développés en adultes, contre 30% et 23% pour *S. haematobium* et *S. intercalatum*, respectivement (B. L. Webster & Southgate 2003). En revanche dans ce travail une forte variabilité au sein des combinaisons a pu être observée, mais n'est pas la première fois qu'une forte hétérogénéité est constatée lors de la récupération de vers d'animaux infectés expérimentalement ou naturellement (Viana et al. 1998; Bushara et al. 1980; Murare & Doenhoff 1987).

Pathologie induite (hépatosplénomégalie)

Nous avons analysé la splénomégalie et l'hépatomégalie due à la production massive de globules blancs pour lutter contre l'infection et à l'accumulation d'œufs dans le foie, respectivement. En général, la splénomégalie est proportionnelle au nombre de vers chez l'hôte infecté et l'hépatomégalie est due à la prolificité élevée de ces vers. De façon intéressante, c'est toujours les hybrides qui induisaient la pathologie la plus forte comparée aux hamsters sains et jamais les espèces parentales ou l'hybride naturel Corse. Ceci suggère que certains hybrides sont potentiellement plus pathogènes que les espèces pures.

Prolificité des femelles

La pathologie est principalement liée à la production d'œufs du parasite qui s'accumulent dans divers organes de l'hôte. La prolificité des femelles est donc importante pour la pathologie induite mais également pour la capacité invasive des parasites. En effet, les œufs qui ne quittent pas l'hôte ne participent pas au cycle de vie parasitaire. Autrement dit un parasite avec une bonne valeur adaptative est un parasite qui maintient un équilibre entre une production massive d'œufs et une faible pathologie pour son hôte. Nous avons estimé la prolificité de chaque parasite en nous basant sur le nombre d'œufs retrouvés dans le foie des hamsters. Notre estimation semble faible lorsqu'on la compare à d'autres études mais cela dépend de la méthode utilisée. Alors que l'estimation de la prolificité pour *S. bovis* et *S. haematobium* était de 38 ± 8 et 21 ± 11 , respectivement d'autres études suggèrent que les femelles *S. bovis* pondent en moyenne 95 œufs / jour (Rollinson et al. 1990) et que les femelles *S. haematobium* sont plus prolifiques avec en moyenne entre 130 and 240 œufs / jour (Basch 1991). Quoi qu'il en soit notre étude permet de comparer précisément les espèces parentales aux hybrides générés dans ce travail.

Comme cela a déjà été démontré dans d'autres études les schistosomes hybrides peuvent avoir un meilleur potentiel reproductif (Webster 2003; Wright et al. 1974). Ce potentiel n'était pas visible dans ce travail pour toutes les lignées d'hybrides (**F1'** : 17 ± 8 , **Hybride Corse** : 20 ± 4 , ♂ **F1** x ♀ **Sh** : 17 ± 8) mais variait de 40 ± 10 (♂ **F1'** x ♀ **Sb**) à 172 ± 35 (♀ **F1'** x ♂ **Sb**) œufs pondus par jour en moyenne. De façon intéressante la lignée ♀ **F1'** x ♂ **Sb** qui a induit le plus de morts prématurés chez les hamsters et pas de pathologie induite visible

chez l'hôte avait la prolificité la plus importante (dix fois plus que la souche pure *S. haematobium*).

Morphologie des œufs

La morphologie de l'œuf est une composante essentielle du diagnostic parasitologique mais est aussi en partie responsable de la pathologie. Dans ce travail les œufs des espèces parentales étaient naturellement contrastés en forme et en taille permettant de facilement distinguer l'espèce d'origine. Dès la première génération, les œufs produits par les adultes hybrides présentaient des morphotypes intermédiaires entre les deux espèces et on ne pouvait pas discriminer une infection à partir d'un parasite pur ou d'un hybride. Les œufs issus des rétrocroisements quant à eux ont subi un important gain de taille pouvant dans certains cas atteindre **240.6 x 95.5** µm en moyenne pour la lignée (♀ **F1'** x ♂ **Sb**). Une fois de plus cette lignée était hautement virulente et pathogène, démontrant que la taille des œufs (en plus de la prolificité) est clé dans la pathologie et induite à l'hôte la morbidité.

En effet, une augmentation trop importante de la taille des œufs peut avoir d'importantes conséquences sur l'hôte et donc sur la transmission et le maintien du parasite. La taille des œufs peut donc être la résultante d'une sélection opérée par l'hôte en milieu naturel. De façon intéressante, les œufs produits par l'hybride Corse présentaient principalement un morphotype semblable à celui de *S. haematobium* voire plus petit (107 x 43 µm; (Moné et al. 2015)). Une étude basée sur les mesures des œufs produits par des hybrides de laboratoire entre mâles *S. curassoni* et femelles *S. bovis* montre que la taille des œufs semble diminuer avec le nombre de générations (175 x 65 µm à la génération F1 contre 128 x 34 µm à la génération F4), ce qui pourrait suggérer que la taille des œufs peut indiquer le nombre de générations et/ou les événements de rétrocroisements avec les œufs de petite taille sélectionnés à chaque génération (Rollinson et al. 1990). Quoiqu'il en soit l'hybridation modifie les caractéristiques morphologiques des œufs produits par le parasite et ne permet pas de retrouver le morphotype originel de l'espèce. Ceci prouve une fois de plus (Boon et al. 2017; Kincaid-Smith et al. 2018) que les œufs ne sont pas de bons indicateurs de l'hybridation et peuvent potentiellement mener à des discordances entre la symptomatologie et le diagnostic parasitologique.

Autres traits de vie

Pour finir, des travaux ont montré que les hybrides et notamment les vers adultes issus des croisements entre *S. haematobium* et *S. intercalatum* (Webster 2003; Wright et al. 1974) et *S. haematobium* et *S. mattheei* (Wright & Ross 1980) pouvaient présenter un temps de développement plus rapide et une croissance plus élevée.

Nous avons commencé (en collaboration avec Ronaldo Augusto) à nous intéresser à la morphologie des vers adultes issus des lignées hybrides que nous avons générées au laboratoire afin de déterminer l'héritabilité des traits espèce-spécifique suivant l'hybridation. Un des traits notables que nous avons identifié était une importante augmentation de la taille des vers en particulier à la première génération tandis que l'hybride Corse présentait des vers de plus petite taille. Il serait intéressant de rechercher s'il existe des compromis (Trade-off) entre l'infectivité, la prolificité et le développement des parasites hybrides.

D'autres traits d'histoires de vie sont d'intérêt afin de mieux caractériser les phénotypes des hybrides par rapport à leurs parents. L'heure de l'émission cercarienne (9-10h du matin et 2-3h de l'après-midi pour *S. bovis* et *S. haematobium*, respectivement) (Pages & Théron 1990; Théron 2015) et le nombre de ces larves infectantes produit permettrait d'affiner notre compréhension de la dynamique de transmission chez les hybrides.

Aussi, à des fins d'optimisation du diagnostic parasitologique il serait nécessaire de déterminer le tropisme des parasites hybrides au sein de l'hôte. En effet les sites d'évacuation des œufs (urine et/ou fèces) peuvent être modifiés chez les hybrides, menant à de fausses conclusions sur l'origine intestinale ou urogénitale des parasites.

Enfin, nous ne savons pas quelle est la capacité des hybrides à infecter l'Homme et certains animaux réservoir en fonction de leurs niveaux d'introgression génomique. Pour cela le séquençage massif des hybrides retrouvés chez l'Homme pourrait permettre de répondre à ces questions. Aucun animal n'a à ce jour été identifié avec des vers hybrides (Webster et al. 2013). Des expériences d'infestations expérimentales (sur bovins, ovins, caprins, ou autres hôtes potentiels) pourraient lever le voile sur la capacité des hybrides à infester des hôtes réservoirs.

Finalement, au vu des résultats présentés dans ce travail, une des priorités reste de déterminer la sensibilité des hybrides au seul traitement disponible pour traiter la schistosomiase dans le monde (Huyse et al. 2009; Webster et al. 2013; J. P. Webster et al. 2016).

Conclusion et perspectives

S. haematobium et *S. bovis* présentent tous deux des phénotypes contrastés menant potentiellement à une meilleure adaptabilité des descendants qui héritent des caractéristiques des deux parents. Dans certains cas ce mélange génomique peut se traduire par de la vigueur hybride et une amélioration des traits de vie responsables de la transmission du parasite et de sa capacité invasive. Dans ce travail nous avons mis en évidence de la vigueur hybride à chaque étape du cycle de vie des schistosomes. Au niveau de l'hôte intermédiaire les hybrides sont plus prévalents et disposent d'un spectre d'hôtes plus élevé. Au niveau de l'hôte définitif les modifications de certains traits de vie du parasite notamment ceux liées à leur potentiel reproductif et les œufs qu'ils produisent peuvent avoir de fortes conséquences sur la pathologie et la morbidité chez les hamsters. Les conséquences en matière de santé humaine sont donc à considérer. Cependant sur le terrain ces hybrides pourraient être contre-sélectionnés par rapport à d'autres schistosomes moins virulents. Ensemble ces modifications de traits d'histoires de vie pourraient être responsables d'une intensité et prévalence accrue de la maladie dans les zones où l'hybridation sévit. De plus, compte tenu de la forte aptitude de ces parasites à infecter les mollusques hôtes intermédiaires des deux espèces parentales, ces travaux mettent en évidence une distribution potentielle plus importante de la schistosomiase, avec des risques d'émergence notamment en Europe et particulièrement en Espagne et en Corse où *Bulinus truncatus* et *Planorbarius metidjensis* sont présents et fortement susceptibles aux parasites hybrides mais aussi aux espèces pures. La présence dans de nombreuses régions européennes des hôtes nécessaires à la transmission du parasite doit être prise en compte afin d'anticiper de futures émergences.

Discussion générale et perspectives

Remise en contexte

Les changements globaux (changements climatiques et flux de populations) font partie des grandes préoccupations du 21^{ème} siècle et ont de fortes répercussions sur la société. En plus d'entraîner une baisse de la biodiversité via l'extinction d'espèces (on parle actuellement de la 6^{ème} extinction de masse), ils peuvent également favoriser la propagation de maladies infectieuses, et notamment celles causées par les helminthes (Kim et al. 2014; Blum & Hotez 2018; Bouzid et al. 2014). Les changements globaux peuvent aussi conduire à l'émergence de maladies infectieuses habituellement tropicales dans des régions plus tempérées (Léger & Webster 2016; King et al. 2015; Detwiler & Criscione 2010). En effet, en modifiant l'aire de répartition habituelle des espèces, de nouvelles interactions biotiques entre vecteurs et pathogènes, mais également entre différentes espèces de pathogènes peuvent être favorisées. Ces dernières peuvent mener à des cas atypiques de reproduction, notamment l'hybridation entre entités génétiques distinctes. L'hybridation a longtemps été considérée comme un événement rare lié à une anomalie dans le système de reproduction des espèces (Mayr 1963; Mallet 2005). Aujourd'hui les hybrides sont de mieux en mieux identifiés, Ces croisements peuvent constituer des forces évolutives majeures pour de nombreuses espèces (Seehausen 2004; Barton 2001; Tsai et al. 1994; Mavárez et al. 2006; Mallet 2007). En effet, l'hybridation modifie bien plus rapidement les phénotypes des individus que ceux potentiellement générés par les mutations aléatoires. La sélection qui est opérée sur les individus hybrides peut mener à la genèse de nouveaux traits dans les populations, voire à la spéciation (Seehausen 2004; Barton 2001; Tsai et al. 1994; Mavárez et al. 2006; Mallet 2007).

L'importance et la fréquence de l'hybridation restent peu connues et c'est particulièrement le cas pour les espèces en interactions durables. Chez les pathogènes et plus particulièrement chez les parasites l'hybridation est encore probablement largement sous-estimée et très peu d'attention a été accordée au rôle que l'hybridation et l'introgession génomique peuvent jouer dans l'évolution (Detwiler & Criscione 2010; Brasier et al. 1999; King et al. 2015; Arnold 2004; Machado & Ayala 2001). En comparant les traits d'histoire de

vie des hybrides à leurs espèces parentales nous pouvons déterminer si l'hybridation procure ou non une valeur adaptative supérieure à ces nouveaux parasites et s'ils constituent un risque accru de transmission des maladies. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle de l'hybridation dans l'émergence de la schistosomiase en Europe en 2013. Aussi, ce travail s'insère plus généralement dans le contexte de la transmission et du contrôle de cette maladie en zones endémiques, et la question de l'hybridation comme une force évolutive importante dans sa dynamique.

Quelques perspectives évolutives

Dès lors que le parasite responsable du foyer de transmission de schistosomiase urogénitale en Corse a été caractérisé comme un hybride entre *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma bovis*, de nombreuses questions se sont posées sur le rôle de l'hybridation dans cette émergence. Une des premières était de savoir s'il s'agissait d'hybrides de première génération ou si dans le cas d'une hybridation plus ancienne quelle était l'étendue de l'introgession. Pour que ce processus ait lieu les génomes des deux espèces doivent être compatibles. Ils doivent être suffisamment perméables pour échanger du matériel génétique. Cette perméabilité n'avait jamais été démontrée à l'échelle génomique chez les schistosomes. La technique de choix pour l'identification des hybrides est basée sur l'analyse de deux marqueurs principaux : un mitochondrial (COI) et un nucléaire (ITS). Cependant cette technique présente un certain nombre d'inconvénients et n'est pas toujours fiable. Premièrement elle ne permet pas de déterminer le degré d'introgession génomique, et deuxièmement elle sous-estime le nombre d'hybrides détectés (Boon et al. 2018). Une alternative serait d'utiliser un plus grand nombre de marqueurs discriminants entre espèces, notamment des marqueurs SNPs représentatifs de nombreuses régions génomiques, voire du séquençage massif. Ceci semble évidemment peu réaliste en raison du nombre d'individus à traiter et du prix actuel mais pourrait être une alternative dans le futur.

L'analyse du niveau d'introgession génomique de la souche responsable de la schistosomiase urogénitale qui a émergé en Corse a révélé qu'un quart de son génome était du type *S. bovis* (**Chapitre 1.2 Caractérisation du schistosome qui a émergé en Corse** (Kincaid-Smith et al. 2018)). Ce résultat exclue donc que l'hybride identifié en Corse puisse

résulter soit d'une hybridation locale (1^{ère} génération) ou d'une simple capture mitochondriale. On peut alors se demander comment ces espèces maintiennent leur intégrité génomique, tout en produisant une descendance viable après une évolution indépendante au sein d'hôtes différents. En effet, *S. haematobium* et *S. bovis* sont deux espèces sœurs appartenant au même clade (*haematobium*) mais qui présentent des spécificités et des sites de vie dans l'hôte définitif différents. On pensait traditionnellement que le tropisme des parasites dans l'hôte définitif (vaisseaux sanguins autour de la vessie pour *S. haematobium*, et autour du tube digestif pour *S. bovis*) empêchait les appariements hétérospécifiques. Cependant, les hybrides entre *S. bovis* et *S. haematobium* sont de plus en plus souvent détectés et semblent grandement perméables aux flux de gènes entre espèces comme cela a pu être démontré par l'analyse des niveaux d'introgession génomique de l'hybride Corse.

Le temps de divergence entre *S. haematobium* et *S. bovis* n'a donc vraisemblablement pas été suffisant pour fortement différencier génétiquement ces espèces et les empêcher de se reproduire. Ceci est probablement en partie lié au caryotype conservé entre les espèces du genre *Schistosoma* qui contiennent tous $n = 7$ paires de chromosomes et une paire de chromosomes sexuels ZZ ou ZW (Grossman et al. 1981). La mise en contact accrue de ces espèces, potentiellement sous l'effet des changements globaux, pourrait donc avoir permis de re-homogénéiser (localement au moins) le pool de gènes entre les deux protagonistes. Au Sénégal où les hybrides ont été identifiés en abondance (Huyse et al. 2009), la création de zones d'irrigations et de barrages aurait contribué à augmenter les zones de contact entre humains, animaux, parasites, et leurs vecteurs favorisant donc l'hybridation. Quoiqu'il en soit la spécialisation des espèces de parasites à un hôte particulier devrait être un mécanisme d'isolement pré-zygotique important, limitant l'hybridation et favorisant la spéciation sur des temps évolutifs relativement longs. En revanche si cette spécificité d'hôte est rompue ponctuellement l'interaction entre espèces de parasites peut être favorisée. Cela ne veut pas pour autant systématiquement dire qu'elles vont pouvoir se reproduire. Certaines espèces apparentées parviennent à conserver leur identité génétique tout en parasitant les mêmes hôtes, grâce à des mécanismes d'isolement reproducteur. Par contre, l'isolement « par l'hôte » peut être si efficace que les espèces peuvent ne pas avoir acquis d'autres mécanismes limitant l'hybridation quand l'occasion se présente. Par conséquent,

l'absence d'incompatibilité au niveau reproducteur entre les espèces de schistosomes infectant les humains et les animaux pourrait faciliter le flux de gènes lorsque la spécificité d'hôte est rompue. C'est exactement ce qu'on a observé pour *S. haematobium* et *S. bovis* qui s'apparient *a priori* de façon aléatoire au laboratoire, produisant une descendance viable et potentiellement plus vigoureuse. Sur le terrain cet évènement a pu ne se produire qu'un petit nombre de fois lors de la coinfestation d'un « mauvais » hôte, mais nos résultats de choix sexuels entre *S. haematobium* et *S. bovis* montre que l'occurrence naturelle d'hybridation en zones sympatrique peut potentiellement être élevée en cas de rupture de spécificité d'hôte et ceci peut avoir d'importantes conséquences épidémiologiques. Notre analyse du transcriptome des couples appariés de manière homo- ou hétérospécifique nous a également permis de mettre en évidence un différentiel dans l'expression de gènes liés à l'appariement et la reproduction entre mâles et femelles. Ceci souligne que des modifications moléculaires sont induites en réponse à l'appariement hétérospécifique comparé à un appariement homospécifique mais permettent également d'initier les voies de la reproduction.

Pour conclure sur cette partie concernant l'intégrité génomique des espèces et leur capacité à s'hybrider, l'ensemble de nos analyses suggèrent que, i) il ne semble pas y avoir de barrière pré-zygotique à la reproduction entre *S. haematobium* et *S. bovis*, l'intégrité génétique de ces deux espèces étant principalement conditionnée par la spécificité du parasite pour son hôte définitif, ii) la régulation des voies moléculaires impliquées dans l'appariement entre mâles et femelles suggère que ces deux espèces ont conservé une capacité à se reproduire similaire aux couples homospécifiques, iii) les génomes de ces deux espèces sont hautement perméables aux flux de gènes ce qui peut avoir des conséquences sur le phénotype des descendants potentiellement plus vigoureux que les espèces parentales.

Hybridation et vigueur hybride : des parasites plus ou moins performants que leurs parents ? Quelles conséquences pour la capacité invasive et la transmission du parasite sur le terrain ?

Pour donner des éléments de réponse à ces questions il est important de considérer sous quel angle nous abordons l'étude de la vigueur hybride des parasites. En effet, cette notion

de vigueur va dépendre à la fois de l'espèce parentale à laquelle nous comparons les descendants mais aussi du compartiment hôte au sein duquel nous comparons les parasites. En comparaison à l'espèce de schistosome spécifique à l'Homme (*S. haematobium*), l'hybridation semble améliorer de manière générale les capacités invasives du parasite vis-à-vis de l'hôte intermédiaire. En effet, les descendants générés expérimentalement dans ce travail ont dans la majorité des cas une capacité accrue à infecter et à se développer chez les hôtes intermédiaires. Le spectre d'hôte intermédiaire est élargi (*Bulinus truncatus* et *Planorbarius metidjensis*), et les prévalences associées le sont également. L'hybridation confère donc aux parasites une distribution potentielle plus large en Afrique et en Europe, et un taux de transmission potentiellement plus élevé sur le terrain. En ce qui concerne l'interaction des parasites avec l'hôte définitif, les hybrides sont généralement plus virulents, ils sont plus infectieux et présentent un potentiel reproductif plus important. En revanche il serait essentiel de pouvoir déterminer les capacités des hybrides à infecter des animaux, et donc leur caractère zoonotique. Si nous savons que ces hybrides ont la capacité d'infester les humains (en Afrique et en Corse), nous ne savons pas quel rôle le bétail (hôte de *S. bovis*) ou d'autres potentiels hôtes réservoirs comme les rongeurs peuvent avoir sur la dynamique de transmission des schistosomes hybrides. Malgré les études menées sur les animaux sur le terrain (Webster et al. 2013), une seule relate la présence de ces hybrides chez des rongeurs au Sénégal (Catalano et al. 2018), et suggère qu'ils pourraient être l'hôte au sein duquel l'hybridation de première génération aurait lieu. Quoiqu'il en soit cette capacité à infecter l'Homme et/ou les animaux peut dépendre des niveaux d'introgression génomique des parasites et constitue un réel risque pour un contrôle efficace et durable de la maladie.

En comparaison avec *S. bovis*, les capacités du parasite sont en général améliorées en ce qui concerne la pénétration et le développement des parasites dans l'hôte définitif expérimental. En revanche, concernant les hôtes intermédiaires les hybrides peuvent être moins vigoureux et en particulier lors des premières générations. Néanmoins dans le cas de rétrocroisements entre la lignée de première génération et *S. bovis* (mais pas avec *S. haematobium*) les hybrides se comportent de façon similaire à l'espèce parentale *S. bovis*. Leur spectre d'hôtes est plus important et les prévalences également. Ceci met en évidence que le niveau d'introgression génomique et le sens du croisement sont importants pour la valeur

adaptative des parasites hybrides. En plus de cela nous devons considérer du point de vue de *S. bovis* que l'hybridation puisse permettre à ce parasite du bétail d'infecter l'Homme. C'est en effet le cas et l'exemple le plus frappant est probablement celui du parasite Corse qui contient près de 25% de matériel génétique de *S. bovis* et qui malgré cela est capable d'infester des humains (Kincaid-Smith et al. 2018; Boissier et al. 2016).

Il est également essentiel de souligner que nous avons observé que les hybrides expérimentaux, dès la première génération provoquaient en général une pathologie et une morbidité accrue comparée aux espèces pures. Il a été suggéré que les parasites non spécifiques aux hôtes qu'ils infectent peuvent être plus virulents en l'absence de coévolution (Kirchner & Roy 2002; Anderson et al. 1982). Dans notre cas la plus forte infectivité des cercaires et la production accrue d'œufs par les parasites sont vraisemblablement la cause de cette morbidité mais la taille des œufs produits par les hybrides en est aussi fortement responsable. En effet, comparés aux espèces parentales, les œufs produits par certains hybrides étaient deux fois plus gros (surface totale). Ceci implique que les œufs ne peuvent pas gagner aussi facilement le milieu extérieur, ils s'accumulent et provoquent de sérieuses pathologies rapidement fatales pour l'hôte. En plus des implications importantes en matière de santé humaine et animale, ceci peut être délétère pour les parasites. En effet, en tuant trop rapidement leurs hôtes, les parasites n'ont plus une transmission optimale et peuvent par conséquent être contre-sélectionnés sur le terrain. Ceci pourrait expliquer pourquoi certains croisements sont identifiés sur le terrain alors que d'autres sont plus rares. Cependant, les parasites peuvent présenter différentes stratégies tout aussi efficaces pour faire perdurer leur cycle de vie. La première stratégie parasitaire peut consister à produire une grande quantité de stades parasitaires permettant la dispersion du parasite (œufs, miracidium et cercaires). Ainsi le parasite a de meilleures chances de rencontrer son hôte (intermédiaire et/ou définitif) dans l'environnement. En revanche, le fort niveau d'infectivité associé et la production massive d'œufs par le parasite dans l'hôte vertébré peuvent être néfaste pour les deux protagonistes. Il en va de même pour une forte production cercarienne chez les mollusques qui peut induire une interaction moins durable et la mort des hôtes. La transmission des parasites repose donc dans ce cas sur des temps réduits. À l'inverse, un parasite peut aussi augmenter sa valeur adaptative en produisant moins de ces stades dispersants

potentiellement néfastes pour l'hôte et donc bénéficier d'une interaction plus durable avec leurs hôtes. Ces deux stratégies semblent efficaces et nous ne pouvons pas supposer laquelle est meilleure que l'autre car elle peut dépendre de l'hôte affecté, de ses activités aquatiques et de la densité d'hôte présents dans un environnement donné.

En ce qui concerne le parasite hybride présent en Corse, il est difficile d'affirmer que c'est son caractère hybride qui lui a permis d'émerger en Europe. Cette souche se comporte au laboratoire de manière assez similaire à *S. haematobium*. Elle n'a pas la capacité d'infecter une plus large gamme de mollusques, ni de présenter des niveaux de prévalence plus élevés et elle ne présente a priori pas de traits de virulence supérieurs chez l'hôte définitif de laboratoire. En revanche, ce parasite est particulièrement compatible avec la souche de *Bulinus truncatus* présente en Corse et c'est cette capacité qui lui a permis vraisemblablement de s'établir dans la rivière du Cavu. Notre souche de *S. haematobium* provenant du Cameroun n'était pas capable d'infecter les mollusques prélevés en Corse et il se peut que ce soit les gènes de *S. bovis* présents chez l'hybride qui lui confère cette très forte compatibilité. Les autres avantages sélectifs que pourraient lui procurer ces gènes restent à déterminer. En tout cas il est souvent admis que les hybrides peuvent présenter de meilleures réponses aux stress environnementaux et ceci est particulièrement pertinent dans notre situation où un parasite tropical est confronté à un nouvel environnement biotique et surtout abiotique dans nos latitudes où les températures baissent fortement en hiver. Il est aussi intéressant de considérer que c'est peut-être cette similarité de phénotype entre la souche Corse et *S. haematobium* qui a permis à l'hybride de s'établir en Afrique de l'Ouest et d'émerger en Europe. En effet, ce parasite est sans doute le résultat d'une forte sélection opérée par l'hôte humain. Une fois présente chez l'Homme la spécificité d'hôte des espèces a pu favoriser les rétrocroisements de l'hybride avec la souche pure de *S. haematobium* comme la prédominance de matériel génétique appartenant à cette espèce le suggère. Ceci a potentiellement conduit à maintenir un fin équilibre entre gènes de *S. haematobium* et gènes de *S. bovis*. La combinaison résultante est potentiellement un optimum sur le terrain entre dynamique de transmission du parasite et pathologie induite à l'hôte. Quoi qu'il en soit malgré la forte aire de répartition de ces hybrides sur le terrain, la distribution des hybrides semble assez hétérogène notamment au Sénégal (Boon et al. 2018). Il faudrait pouvoir déterminer si les populations hybrides sur le terrain sont issues

d'une même lignée, ou si d'autres populations distinctes d'hybrides sont également présentes avec une structuration génétique des parasites hybrides liée à la localité et/ou aux hôtes qu'ils utilisent.

Du point de vue moléculaire, c'est la première fois que les modifications transcriptionnelles induites par l'hybridation sont étudiées au sein des schistosomes. Malgré le fait que nos premières analyses encore superficielles nécessitent des analyses complémentaires, nos résultats semblent prometteurs. Ils concordent avec d'autres études en matière de fonctions associées aux gènes différentiellement exprimés entre parents et hybrides (développement, croissance, réponse au stress et changements métaboliques) (Chen 2010). Les bases moléculaires de la vigueur hybride, mais aussi les modifications des traits d'histoire de vie observés dans notre travail impliquent donc certainement un ensemble de gènes liés à ces fonctions. Les changements phénotypiques observés pourraient également être liés à une régulation épigénétique et une large reprogrammation transcriptionnelle. Il sera nécessaire d'explorer plus en profondeur le mode d'action des gènes impliqués dans les phénotypes observés pour déterminer la contribution respective des génomes et allèles parentaux. Quoiqu'il en soit ce travail offre une réelle opportunité pour contribuer à démêler les bases moléculaires de la vigueur hybride chez un organisme non modèle.

Pour conclure sur cette seconde partie, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la vigueur hybride serait la résultante du sens du croisement et des niveaux d'introgression génomique qui composent l'hybride. Les hybrides peuvent être plus virulents que les espèces parentales et plus particulièrement *S. haematobium*, l'agent typique de la maladie chez l'humain. Les hybrides disposent d'une capacité invasive et d'une distribution potentielle plus importante à condition qu'ils ne soient pas contre-sélectionnés dans leur environnement. En effet, les hybrides peuvent potentiellement être plus pathogènes que les espèces parentales et peuvent induire une plus forte morbidité. Ces phénotypes sont déterminés par des modifications transcriptionnelles de grande envergure et qui touchent principalement des fonctions associées au développement, à la croissance mais aussi les réponses aux stress des hybrides comparés aux parents. La prévalence des hybrides ajoutent un énième facteur à prendre en considération dans la délicate tâche du contrôle de la schistosomiase dans le monde.

Parasite hybride et diagnostic médical de la Bilharziose

Il est donc important de diagnostiquer les infestations hybrides avec plus d'attention sur le terrain. Malheureusement, nous avons également vu au travers de cette thèse que l'hybridation peut se révéler difficile à identifier. Les méthodes actuelles reposent sur, i) un diagnostic parasitologique (morphologie des œufs, et site d'élimination), ii) des méthodes moléculaires (sérologiques). La morphologie de l'œuf ne semble plus être un indicateur fiable et assez sensible pour déterminer l'agent responsable de l'infection, d'autant plus que certains patients n'excrètent pas d'œufs, ou les excrètent par des voies atypiques dans le cas de l'hybridation. Les méthodes moléculaires appliquées directement sur le parasite (œufs ou miracidium) permettent d'identifier l'espèce et dans certains cas le statut hybride du parasite mais encore faut-il pouvoir déterminer qu'un patient est infecté. Le diagnostic humain de la schistosomiase peut être délicat notamment lorsque les charges parasitaires sont faibles, et de nombreux patients (deux tiers en Corse) sont asymptomatiques. Des kits commerciaux de diagnostic sérologique existent et reposent sur des tests ELISA, un test d'hémagglutination indirecte (IHA), et sur un Western Blot (Hinz et al. 2017). Lors de l'épidémie en Corse, les autorités sanitaires françaises ont recommandé l'utilisation simultanée de deux méthodes (IHA et ELISA), suivie d'une troisième analyse plus sensible par Western Blot dans les cas où les autres tests étaient discordants. La majorité des kits de diagnostic sérologique sont à ce jour élaborés à partir d'antigènes de *S. mansoni*, et il a été montré que ces tests sont moins sensibles pour la détection d'autres espèces comme *S. haematobium* (Kinkel et al. 2012). Ceci suggère qu'il existe une communauté antigénique spécifique qui sera reconnu par le système immunitaire des patients et qu'en fonction de la réaction immune le test se révélera positif ou pas. Une autre évidence de l'importance de cette communauté antigénique est la création d'un nouveau test Western Blot (Schistosoma LDBio II) qui est un mélange d'antigènes de plusieurs espèces. Ce test a été développé à partir des résultats obtenus sur le serum des patients exposés en Corse. L'influence potentielle du statut «hybride» des schistosomes sur l'efficacité du diagnostic sérologique n'est pas connue et doit être évaluée. En revanche on peut légitimement imaginer une baisse de la sensibilité de la détection d'infections hybrides en fonction du répertoire d'antigènes présents chez l'hôte. Afin d'améliorer la sensibilité du diagnostic sérologique l'élaboration de kits avec des antigènes représentatifs, i) d'espèces différentes, mais aussi ii)

de populations différentes de schistosomes d'une même espèce, devrait permettre d'avoir une meilleure représentativité du polymorphisme antigénique existant sur le terrain.

Quels risques d'émergence (ou ré-émergence) de la Bilharziose en Europe ?

Evaluer les risques d'émergence et de transmission de maladies infectieuses est une tâche délicate. Il en est de même pour la schistosomiase, principalement conditionnée par la répartition de mollusques vecteurs spécifiques. Je vous propose de terminer cette thèse avec un article d'opinion que nous avons publié dans «Trends in Parasitology » qui permet d'aborder conceptuellement les raisons pour lesquelles nous sommes toujours incapables de prédire précisément ces risques.

- **Publication : Kincaid-Smith J, Rey O, Toulza E, Berry A, Boissier J. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. Trends Parasitol. Elsevier; 2017; doi:10.1016/j.pt.2017.04.009**

C'est la seconde fois suite à l'épisode en 1920 au Portugal que la schistosomiase émerge en Europe. Ces émergences sont obligatoirement associées à la présence d'hôtes intermédiaires permettant la transmission du parasite. Sans la présence de ces hôtes en Europe la schistosomiase resterait tropicale. Connaître l'aire de répartition des mollusques vecteurs de la maladie constituerait donc d'évaluer la distribution possible du parasite en zone d'endémie, mais également les zones de distribution théorique de *S. haematobium* et *S. bovis* et les risques d'endémicité en Europe. Néanmoins, d'autres facteurs limitants s'ajoutent à la distribution des hôtes intermédiaires qui conditionnent la présence du parasite. Les conditions climatiques tempérées du continent Européen sont potentiellement défavorables au développement du parasite du moins en hiver. De plus, malgré les éléments apportés par cette thèse nous ne connaissons pas l'interaction entre mollusques Européens et parasites africains. Pour finir, les activités aquatiques des Européens qui se limitent principalement aux loisirs et à l'agriculture, ainsi que les normes et conditions sanitaires développées dans les pays occidentaux ne sont pas favorables à la transmission du parasite et l'émergence des foyers de schistosomiase de large envergure comme en Afrique, qui seraient donc potentiellement plus faciles à contrôler dans ce contexte. Dans ce papier nous discutons des leçons à tirer des émergences Européennes

afin de mettre en œuvre des procédures permettant de mieux quantifier les risques futurs. Nous proposons une réflexion basée sur les facteurs qui nous empêchent actuellement de prédire ces risques à travers un concept de filtre écologique qui conduit à l'interaction entre les parasites et leurs hôtes, notamment le filtre de rencontre et le filtre de compatibilité.

Opinion**Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks**Julien Kincaid-Smith,^{1,†} Olivier Rey,^{1,†} Eve Toulza,¹ Antoine Berry,² and Jérôme Boissier^{1,*}

The recent recurrent outbreaks of urogenital schistosomiasis in the south of Europe were unanticipated and caught scientists and health authorities unprepared. It is now time to learn lessons from these outbreaks and to implement concrete procedures in order to better quantify the risks and prevent future outbreaks of schistosomiasis in Europe. In this context, we propose a reflection on the factors that currently hamper our ability to quantify these risks and argue that we are incapable of predicting future outbreaks. We base our reflexion on an ecological two-step filter concept that drives host–parasite interactions, namely the encounter and the compatibility filters.

Schistosomiasis Outbreaks in Europe

Global changes, including both natural and anthropogenic environmental modifications, promote the spread of exotic pathogens worldwide and disease outbreaks [1]. In particular, with the ongoing rise in temperature and the intensification of human activities, it is expected that tropical and subtropical vector-borne diseases will expand to higher latitudes [2–6]. So far, concrete cases of autochthonous transmission of tropical infectious diseases in temperate areas remain scarce. The most alarming examples of pathogen geographical range expansions are the recent cases of locally acquired arthropod-borne diseases such as dengue, malaria, and chikungunya in southern Europe [7–10]. Climate change and trade of car tyres promoted the establishment of the mosquito vector species around the Mediterranean Sea, hence allowing the parasites to complete their life cycles and emerge locally. To face the risk of arthropod-borne diseases, the European Union (EU) established the VBORNET network in 2010. This One Health consortium mobilized both entomological and public health specialists to assist the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). This network was completed by the VectorNet project in 2014 to include animal disease agents. Today, up-to-date distribution maps of mosquitoes, ticks, and sandflies are freely available on the website of the ECDC. In addition to the risk map, the ECDC has published guidelines for the surveillance of native and invasive mosquitoes in Europe [11,12]. These resources paved the way to concrete and applied operational processes for a better surveillance of mosquitoes and to prevent future outbreaks.

For several reasons, the risks of snail-borne diseases in Europe have been overlooked so far. First, until very recently, freshwater ecosystems received less ecological attention than terrestrial systems [13]. Second, the expansion, and ultimately the establishment, of snail intermediate host species that have coevolved with parasites from tropical countries to Europe is expected to be limited because of the low dispersal ability of freshwater snails. However, in March 2014, clusters of human urogenital schistosomiasis cases, transmitted through freshwater *Bulinus* snails, were simultaneously diagnosed in French and German hospitals [14–16].

Trends

Global changes promote the establishment and spread of infectious diseases worldwide. Several tropical and subtropical vector-borne diseases have recently emerged in more temperate geographical areas, demonstrating that they need further considerations.

An autochthonous urogenital schistosomiasis outbreak has recently been identified in Southern Europe (Corsica, France). The causative parasitic agent is a hybrid between a human-specific and a livestock-specific schistosome species.

Quantifying the emerging risk of vector-borne disease requires knowledge of the ecological characteristics of parasites and their potential vectors as well as of the interactions between protagonists in Northern latitudes.

Host–parasite interactions are driven by an ecological two-step filter concept (the encounter and the compatibility filters). Global changes and hybridization may affect both filters, hence hampering our ability to quantify the risk of future emergence. Thus, we are still incapable of predicting future outbreaks, and new tools need to be developed.

¹Univ. Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France

²Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Toulouse and Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM U1043, CNRS UMR5282, Université de Toulouse, Toulouse, France

These patients had never visited a *Schistosoma haematobium*-endemic country (i.e., Africa, Arabian Peninsula), but all the patients had spent their holidays in Corsica in August 2013. Corsica is a favourite destination for tourists from Europe and overseas, and more specifically during summer. All the infected individuals had been in contact with the Cavu River (southern Corsica) which is famous for its crystalline and warm natural pools. Subsequently, the INVS (Institut National de Veille Sanitaire) and the ECDC published a rapid risk assessment. Following a massive campaign for diagnosis in April 2015, more than 100 further cases which had contracted the disease during summer 2013 were reported in France. Surprisingly, after intensive screening for the presence of the parasite, no *Bulinus truncatus* snails from the Cavu river were found to be infected with schistosomes, highlighting the difficulty of detecting the parasite in the field [17]. Moreover, no potential animal reservoir host was found in the vicinity of the river [17]. However, during the summer of 2015 a new case of acute endemic schistosomiasis was acquired in Corsica, indicating that transmission is persisting locally and pointing out the risk for further infections [18]. In line with this outbreak, the rapid risk assessment of the ECDC stated: “*The autochthonous transmission of S. haematobium in Corsica in 2013 is a local public health event that highlights a potential risk for other receptive areas of southern Europe. Therefore, there is a need to consider enhancing epidemiological surveillance for schistosomiasis in the EU.*”. Contrary to arthropod-borne diseases, the emergence of schistosomiasis in Europe was unexpected, and both the scientific community and health authorities were caught unprepared. We discuss here the reasons why we are currently incapable of predicting future outbreaks of this neglected but severe tropical disease in Europe and address several directions that would greatly improve our ability to better evaluate these risks. We base our reflection on the fundamental two-step filter concept, including the encounter and the compatibility filters, as first proposed by Louis Euzet and Claude Combes in the 2000s [19,20] and examine how global changes are expected to alter these filters and hence increase the risk of schistosome parasites establishing and spreading throughout Europe.

[†]These authors made equal contributions.

*Correspondence: boissier@univ-perp.fr (J. Boissier).

Host–Parasite Association Filters

Host–parasite interactions can be analysed through the concept of association filters. In all systems formed by two organisms, natural selection tends to maximise their fitness independently [21]. In a host–parasite couple, a filter can be seen as a virtual phenotype defined by both the genome of the parasite and the genome of the host [19]. At the parasite level, filters need to be open to accomplish their life cycle, therefore natural selection will tend to select genes allowing both the encounter (encounter filter open) and the survival of the parasite (compatibility filter open) associated with its host. On the contrary, hosts will tend to close these two filters, and natural selection will select genes allowing them to avoid (encounter filter closed) and kill (compatibility filter closed) the parasites. When these filters are synchronously opened in a particular area, and for a particular host–parasite association, there is a potential risk for disease emergence. Evaluating the status of these two filters (open or closed) offers the opportunity to quantify the risk for schistosomiasis emergence in Europe.

Encounter Filter

The encounter requires spatial and temporal overlap between the host and the parasite. Quantifying the risk of emergence and spread of schistosomes in Europe thus partially depends on our knowledge concerning (i) the geographical distribution of all potential intermediate snail hosts for the parasites to complete their life cycle locally, and (ii) the dispersion of parasites through their definitive hosts and in particular humans.

What Do We Really Know about the Distribution of Schistosome Intermediate Snail Hosts in Europe?

The answer is: very little. Among the 2090 freshwater snail species for which the geographical range was documented in Europe, *Planorbis metidjensis* and *B. truncatus* are intermediate

Box 1. Snail Fluctuation in Space and in Time in the Cavu River

The Cavu River is where the parasite emerged in Corsica in both 2013 and 2015. For snail sampling, the river was divided into 9 sites corresponding to a transect of 200 to 300 meters long [17]. The contamination that occurred in 2013 concerned only upstream sites numbered 8 and 9 (2 out of 9 sites) [17]. Unexpectedly in 2015, patients were infected only at site 5, where neither snails nor parasites had been recovered in 2013 [18]. During the same year, important variations in snail intensity were also observed weekly. Figure I shows the total number of snails recovered at sites 5, 8, and 9 in the summer of 2016, during the tourist season (same sampling effort in each site and for each week). The number of snails increased from 50 to 750 between mid-June (week 24) and the end of August (week 35), indicating that the snail population greatly increased during the tourist season. The presence of tourists is also at a maximum between mid-July and mid-August, thus potentially increasing the transmission risks.

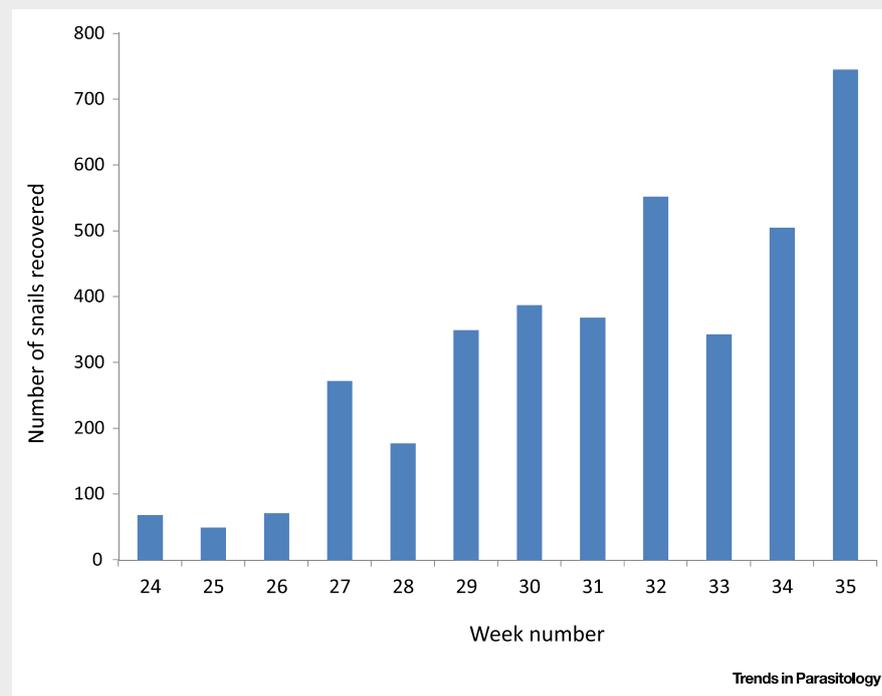


Figure I. Total Number of Snails Recovered Weekly over Sites 5, 8, and 9 in the Cavu River from Week 24 (mid-June) to Week 35 (end of August), 2016.

hosts for schistosome species in Africa [22], especially the human-infecting species *S. haematobium*. However, most of the sampling references for these two host species are out of date [22]. Moreover, snail populations are highly dynamic in space and time (Box 1). *P. metidjensis* is expected to be present in all the Iberian Peninsula (Spain and Portugal) and has never been observed elsewhere in Europe [22]. Two recent records confirm the current abundance of this snail species in the south of Spain (in the province of Huelva and in Almeria) [23,24]. *B. truncatus* is expected to be present in all the Mediterranean islands, in the Atlantic and Mediterranean coastal zones of the Iberian Peninsula, in the western coastal zone of Italy, in Greece, and in the south of France [22]. In southern Spain, *B. truncatus* has been recorded recently in the province of Huelva [23], in Almeria and Alicante [25], and in northern Spain, in Catalonia [26] and in Galicia provinces [27]. In France, *B. truncatus* is abundant in the island of Corsica [28] and has been sparsely observed in the south of the mainland, in the piedmont of the Pyrenees [29] and around Montpellier [30]. All these records are sporadic and are clearly insufficient to quantify the spreading potential of *S. haematobium* in Europe. Determining the distribution of intermediate snail hosts is hindered by the available methods used to collect and identify species. Classically, freshwater snail detection is performed by scooping the grasses in the bank of the water bodies and turning the stones at the bottom of the river. Then, the identification of the snails to the

species level is anything but trivial and requires thorough malacological knowledge. Such an approach is tedious and time consuming and there is thus an urgent need to develop more efficient tools to improve extensive spatial and temporal snail surveys.

Moreover, there is also very little information concerning the ability of *S. haematobium* to infect alternative local European snails. Host shifts can occur when parasites disperse to new environments in which their natural primary hosts are absent [31]. Schistosomes, and especially *S. haematobium*, are known to be specific to their snail hosts in their native range, and host-switching is thus expected to be limited [32]. However, *S. haematobium* host-switching has promoted an outbreak of urogenital schistosomiasis in India in the middle of the last century [33]. In 1952, urogenital schistosomiasis foci were reported in Gimvi village (Bombay State), with more than 200 people excreting typical *S. haematobium* terminal spine eggs [34]. In response to this unexpected outbreak, notably due to the complete absence of the known potential intermediate host vectors in this area, Gadgil & Shah [35] experimentally exposed several local snail species to *S. haematobium* miracidia collected from the urine of infected patients. Against all odds, *Ferrissia tenuis* was successfully infected and produced schistosome cercariae [35]. The genus *Ferrissia* is widely distributed in Africa but has never been shown to host schistosome parasites. This outbreak of *S. haematobium* out of its native range clearly indicates that even for apparently highly specific parasites, shifts towards phylogenetically distant hosts may occur. Finally, it is worth stressing that, like *Bulinus*, the genus *Ferrissia* belongs to the family Planorbidae, which is widely distributed across Europe.

Where Does the Risk Come from?

The dispersal of pathogens by air travel and subsequent importation risks in Europe has already been inferred for some arthropod-borne disease such as dengue [36]. In particular, authors quantified the importation risks of dengue into Europe by considering in their model the volume of air-travellers arriving from dengue-infected areas and European cities in which the potential arthropod vector (*Aedes albopictus*) is present. They found that, in 2010, Milan, Rome, and Barcelona were hotspots for dengue importation and autochthonous outbreaks, especially from August to October [36]. Concerning schistosomes, the EuroTravNet consortium has recently synthesized 5 years (2008–2012) of travel-related illness ($n = 32\,136$) [37]. Schistosomiasis ranked 12th in the imported disease category (with malaria ranking first), with around 22 cases for 1000 ill patients. Importantly, this study also revealed that patients harbouring schistosomiasis infection are represented in all categories of travellers: business (9%), immigration (18%), missionary/volunteer (33%), tourism (21%), and people visiting friends and relatives (16%); a majority came from sub-Saharan Africa (74%). Considering that around 100 million passengers enter Europe on commercial flights every year [36] the risks for other schistosome outbreaks is a real concern [38–41].

S. haematobium is endemic in 53 countries, mostly in Africa and the middle-East [42]. The parasites responsible for the recent outbreak in Corsica were genetically closely related to parasitic populations from Senegal [17]. Several sociological elements also support the hypothetical Senegalese origin of this parasite. First, urogenital schistosomiasis is present across Senegal, and its prevalence is estimated to be 25% at the national scale [43]. Second, Senegal is a former French colony, and these two countries still have strong commercial and political relationships with important bidirectional population flows. With around 100 000 French tourists every year, Senegal ranks 35th for preferred French tourist destinations, and 50% of tourists in Senegal are from France. In the other direction, France is the first destination for Senegalese people in Europe.

The probability of an encounter between the parasite and its mollusc host is also related to the length of time that the infected patient will be able to excrete eggs. In the case of

Box 2. Imported Schistosomiasis: A Difficult Diagnosis

Diagnosis of imported schistosomiasis may be compromised since these infections are asymptomatic in 30–50% of cases [81–83]. Once the medical diagnosis has been suspected, further laboratory diagnosis validation can also be difficult. Identifying eggs by microscopic examination of patient's urine is poorly sensitive (≈ 20 –30%) since parasite load is often low [81–83]. Another difficulty specific to *S. haematobium* \times *S. bovis* hybrid infection is the possibility of eggs being excreted in urine and/or in faeces. Eggs of *S. haematobium* and *S. bovis* are classically excreted in urine and faeces, respectively. Whether hybrid eggs are preferentially (but not exclusively) excreted in urine, in faeces, or in both, is yet to be determined. In Corsica, only urines were examined, hence raising the possibility of having diagnosed false negatives. Altogether, these different points make diagnosis of imported cases of schistosomiasis difficult, especially for physicians from nonendemic countries who may not be aware of this tropical parasitic disease. Serodiagnosis is the tool of choice for screening and diagnosing of schistosomiasis, even when hybrids are present. Combining two techniques (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and indirect haemagglutination, i.e., IHA) raises the detection sensitivity up to 80–90% with an almost perfect specificity ($\approx 100\%$) [84,85]. A Western blot from LDBio Diagnostics using *S. haematobium* and *S. mansoni* antigens is now available, ensuring optimum sensitivity and specificity in the case of discordant results (http://www.ldbiodiagnostics.com/fichiers_site/a1181ldb/contenu_pages/wb_sch_v18_fr_en.pdf).

schistosomiasis, this duration is often very long for two main reasons. First, the diagnosis of the infection is difficult; it may be delayed or even not performed (Box 2). Second, the lifetime of the adult parasite in its host is long, from 3 to 10 years and up to 40 years [44]. By comparison, this duration of transmission is much longer than for arboviruses, in which the viremic phase of transmission lasts only a few days.

Compatibility Filter

Overlap in host and parasite distribution (i.e., open encounter filter) is necessary but not sufficient to allow the parasites to complete their life cycles. The compatibility filter also needs to be open [19,20]. A host is defined as compatible to a parasite if it provides adequate resource and is incapable of eliminating the parasite with its defense mechanisms. Compatibility between schistosomes and their intermediate snail hosts results from a complex phenotype-to-phenotype interaction between each pair of individuals (parasite and snail) [45]. The compatibility polymorphism is widely documented between *S. mansoni* (responsible for the human mesenteric schistosomiasis) and its snail host, *Biomphalaria glabrata*, at both the populational and molecular levels [46]. Conversely, few studies have yet investigated the levels and mechanisms of compatibility between *S. haematobium* and *Bulinus* or *Planorbarius* snails. We here synthesized all published studies that have experimentally tested the compatibility between various host/parasite strains (see Table S1 in the supplemental information online). Concerning the *S. haematobium*–*B. truncatus* pair, most studies have quantified the compatibility between parasite and snail strains from Africa (either in sympatry or in allopatry). Our synthesis indicates that, at the national scale, sympatric associations are more compatible than allopatric ones in Cameroon [47] – which is in contrast to results obtained in Niger [48]. Moreover, considering that geographic and genetic distances may be correlated for both snail and parasite, we might expect a negative correlation between geographic distances and compatibility under a coevolving scheme. However, we found no significant relationship between geographic distance between parasite and host strains and compatibility (Spearman correlation test; $n = 32$; $r = -0.32$; $P > 0.05$) at the African continent level. Thus, there is no congruence between the coevolutionary history of snails and parasites and their compatibility. Such disconnection clearly hampers our ability to predict which parasite populations are more prone to settle in a given geographic locality, and more particularly which parasite populations from endemic countries constitute the greatest threat to Europe.

In this regard, few and somewhat dated studies have tested the compatibility between parasitic strains from Africa and snail intermediate hosts from Europe. Capron and collaborators [49] found high levels of compatibility between *B. truncatus* from France (Corsica) and an *S. haematobium* strain from Algeria (52.6% of snails were infected when exposed to five miracidia). In the context of the first emergence of schistosomiasis in Portugal in the 1920s,

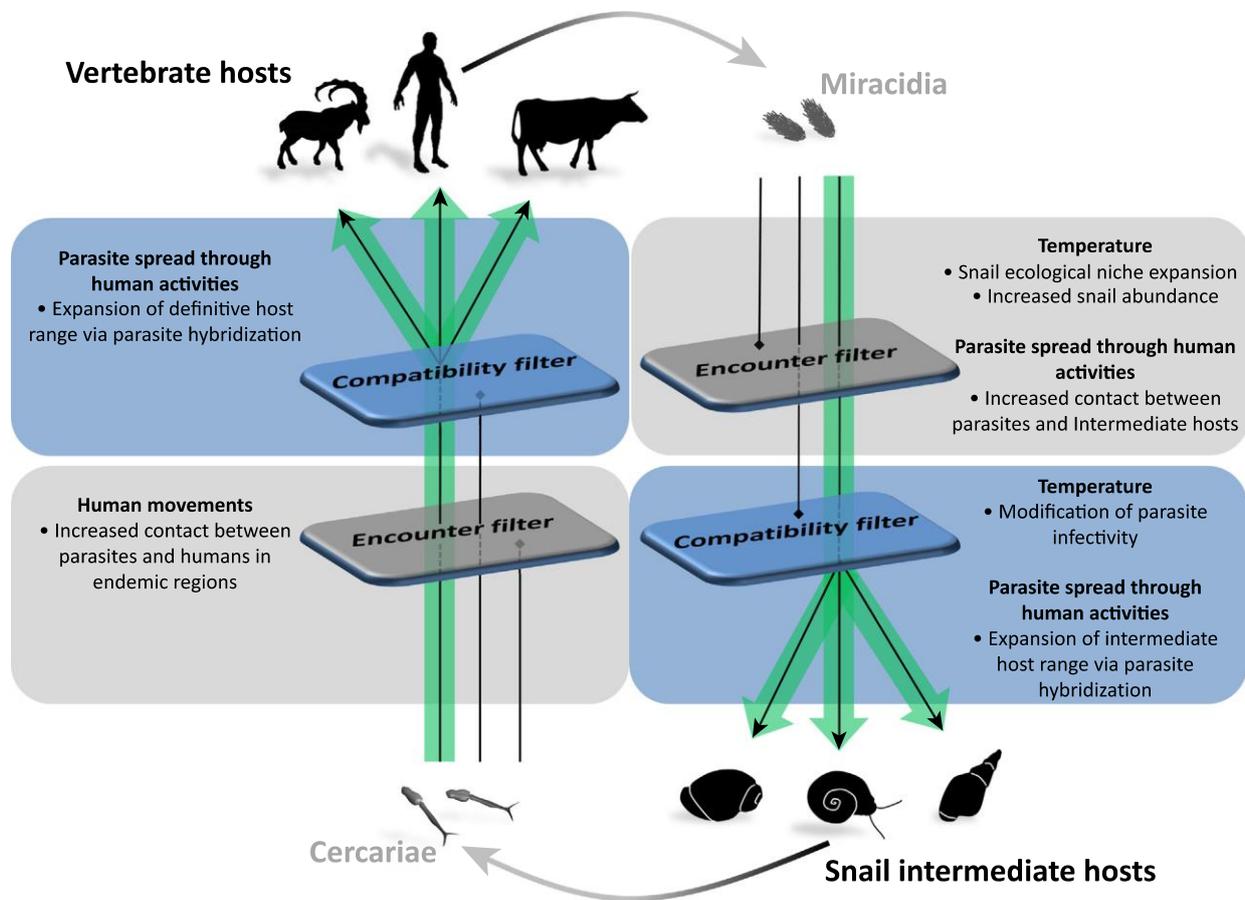
some authors revealed that local *B. truncatus* snails were compatible with parasites coming from Guinea Bissau or Mozambique but not from Angola (Table S1). Compatibility between *S. haematobium* from several African countries and *P. metidjensis* from Portugal and Spain was also experimentally quantified recurrently [50–52]. All of these studies failed to infect snails, suggesting that *P. metidjensis* from Europe is not compatible with *S. haematobium* from Africa. This was surprising given that some local wild populations of *P. metidjensis* were found to be naturally infected with *S. haematobium* at the time of the schistosomiasis outbreak in the 1920s [53]. More recently, some authors found that snail size was critical for infecting *P. metidjensis* with *S. haematobium* and concluded that the failure of experimental infestation of *P. metidjensis* from Portugal could have resulted from the use of nonadequate snail sizes [54–58]. Another hypothesis would be that *P. metidjensis* from Portugal is indeed incompatible with pure *S. haematobium*, and that wild populations of *P. metidjensis* in Portugal were actually infected by hybrids of *S. haematobium* and *S. bovis*, the latter being present in southern Europe [59]. Hybridization between schistosome species is indeed known to widen the snail host spectrum [60]. This last hypothesis is particularly relevant in the European context because *P. metidjensis* is abundant in the Iberian Peninsula, and *S. haematobium* × *S. bovis* hybrids were identified in several West African countries (Senegal, Mali, Benin, and Niger) [61–64] and, more recently, during the outbreak in Corsica [17,62].

Effects of Global Changes on the Encounter and the Compatibility Filters

Quantifying the risks of schistosomiasis emergence in Europe is highly dependent on our ability to predict where and when filters will be opened synchronously (see Figure 1). In the next section we examine how global changes may affect the opening and dynamics of these two filters.

The increases in human activities and movements are by far the most obvious factors that may open the encounter filter by increasing contact probabilities between parasites and snail intermediate hosts. The accruing human bidirectional flows between Europe and endemic tropical and subtropical areas increase the possibility that infected travellers import into Europe parasite strains that are capable of infecting local potential hosts (i.e., *B. truncatus* or *P. metidjensis*) or switch to a novel local snail host species. Finally, increased parasite movements might also promote hybridization events between strains or species. Hybridization in the genus *Schistosoma* is common [65] and can alter the compatibility filter by diversifying the range of both intermediate and final hosts [66]. It is also hypothesized that hybridization may foster adaptation to novel environmental conditions and hence facilitate the establishment and spread of parasites northward [66].

Climatic change is another aspect that can affect both filters. More specifically, rising temperatures are known to impact the distribution and abundance of freshwater snails, thus modifying their potential geographical distribution. Such influence of climate change on the distribution of coevolved snail hosts has been predicted in Africa [67,68] but not in Europe. Together with an increase in parasite dispersion, this geographical expansion is expected to provide optimal environmental conditions (both biotic and abiotic) for the parasite to establish and spread. Changes in seasonality may also have a huge impact on the encounter filter by extending seasons during which the parasite larvae may be emitted by the snails, hence favouring infections of definitive hosts. At the compatibility filter level, temperature increase is known to affect snail susceptibility to schistosomes, reversing a resistant to a compatible phenotype [69]. Until now, few studies have investigated the effect of other global changes on the encounter and compatibility filters in schistosomes. However, it is likely that other factors, such as water quality (e.g., pollution) or river fragmentation, might have impacts on the ability of parasites to infect both intermediate and final hosts, either by affecting compatibility or favouring contacts.



Trends in Parasitology

Figure 1. Schistosomiasis Emergence in Europe: How Global Changes May Open Encounter and Compatibility Filters. Schistosomes display two free larval stages during their lifecycle. The miracidia, which hatch from eggs excreted by a definitive vertebrate host in freshwater, then infest an intermediate snail host. The cercariae are released by a snail intermediate host in freshwater and infest definitive vertebrate hosts. Infestation of both the definitive and the intermediate hosts are conditioned by the opening of the encounter filter (i.e., the spatial and temporal overlap of the larvae and their future hosts) and the compatibility filter (i.e., hosts provide adequate resource and are incapable of eliminating the parasites). Global changes (e.g., climate changes, human activities) may synchronously open these two filters, hence facilitating parasites to accomplish their lifecycle in nonendemic countries.

Concluding Remarks and Future Perspectives

Today we are incapable of inferring the current and future risks of schistosomiasis outbreaks in Europe without answering a few specific questions (see Outstanding Questions). First, it is urgent to determine the geographic distribution of the snail intermediate host populations and to monitor their spatiotemporal dynamics. For this purpose, several tools are currently available. (i) Spatial statistical models have recently been used to predict the theoretical niche and infer the potential spatial distribution of schistosome intermediate snail species in endemic countries [70,71]. (ii) Environmental DNA (eDNA) is promising to detect both parasites and vectors at large spatial and temporal scales [72]. eDNA is widely used in aquatic ecology for the detection of invasive species, or species of interest, or to evaluate ecosystem biodiversity [73]. Recently eDNA has been successfully used for detecting trematode parasites infecting frogs [74], bird schistosomes [75], invasive mosquito vectors (*Aedes albopictus*) [76], and for inferring myxozoan diversity [77]. Combined with punctual malacological surveys and spatial modelling, the eDNA approach would greatly improve our ability to develop ‘real-time’ risk maps of

schistosomiasis transmission in both Europe and all endemic countries [78]. (iii) Finally, the susceptibility level of possible European intermediate hosts for different parasite strains is largely unexplored. Considering the absence of links between geographic distance and compatibility, and without experimental evidence, it is not possible to predict which parasite strains have the highest introduction risk level in Europe. Experimental tests between several parasite strains and several snail hosts are hence needed to address this question.

In the light of our synthesis, it clearly appears that we are far from being able to quantify the risk of schistosomiasis emergence in Europe. Importantly however, the current risk of schistosomiasis outbreaks in Europe compared to arthropod-borne diseases needs to be nuanced for several reasons. First, contact with infected freshwater is a prerequisite for humans to be infected. In Europe, the relationship to freshwater and water contacts are mostly limited to recreational or agricultural activities. Second, the sanitation networks of the European countries greatly limit possible dissemination of schistosomiasis to urban areas. Indeed, helminth eggs are easily removed during water treatment. Systems involving primary and secondary sewage treatment without chlorination are highly successful for removing schistosome eggs (99.5% of eggs are removed) [79]. However, contrary to arthropod-borne diseases, the persistence of the parasite in hosts is very high. In humans, the adult parasite worms can live several decades, emitting eggs throughout their host's lifetime. The fact that several human cases are asymptomatic makes parasite detection problematic. Thus, although the parasites are expected to persist little in the water, they are expected to persist over long periods within their hosts with recurrent swarms of infecting stages in the environment. Concerning the snail intermediate host, the lifetime of infected snails has been documented in the context of a subtropical climate but not in more temperate countries. For instance, we know that adult *Aedes* mosquitoes cannot persist over a winter season [80], whereas we still do not have a clue whether infected *Bulinus* snails are able to persist over that period. This calls for more ecological research to better appreciate the interactions between schistosomes, their hosts, and the continental environment to understand how global changes may promote the emergence of autochthonous schistosomiasis in Europe.

Acknowledgment

This work was supported by the Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). The authors would thank members of the Agence Régionale de Santé de Corse.

Supplemental Information

Supplemental information associated with this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.009>.

References

- Kim, K.H. *et al.* (2014) A review of the consequences of global climate change on human health. *J. Environ. Sci. Health* 32, 299–318
- Bouzid, M. *et al.* (2014) Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. *BMC Public Health* 14, 781
- Rogers, D.J. and Randolph, S.E. (2006) Climate change and vector-borne diseases. *Adv. Parasitol.* 62, 345–381
- Schaffner, F. *et al.* (2013) Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 685–692
- Schaffner, F. *et al.* (2013) Development of guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. *Parasites Vectors* 6, 209
- Schaffner, F. and Mathis, A. (2014) Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet* 14, 1271–1280
- Rezza, G. *et al.* (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370, 1840–1846
- Schaffner, F. *et al.* (2014) Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirology in Europe. *Lancet* 14, 1044
- La Ruche, G. *et al.* (2010) First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 15, 19676
- Gould, E.A. *et al.* (2010) First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1702–1704
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2014) *Guidelines for the Surveillance of Native Mosquitoes in Europe*, ECDC
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2012) *Guidelines for the Surveillance of Invasive Mosquitoes in Europe*, ECDC
- Puth, L. and Post, D.M. Studying invasion: have we missed the boat? *Ecol. Lett.* 8, 715–721
- Berry, A. *et al.* (2014) Schistosomiasis haematobium, Corsica, France. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1595–1597

Outstanding Questions

What are the ecological characteristics of habitat of the schistosome intermediate in Europe?

What is the spatial repartition of schistosome intermediate hosts in Europe?

Are schistosomes able to expand their snail intermediate host range to European endemic snails?

Are schistosome-infected snails able to persist over a winter season in Europe?

What are the schistosome and mollusc intermediate host life history traits in temperate conditions?

Are hybrid schistosomes more virulent than parental species?

Is the invasive capacity of schistosomes limited to hybrid parasites?

Are all African schistosome strains able to emerge in Europe?

What could be the future distribution of schistosome intermediate hosts and host–parasite interactions as a consequence of climate change?

Can we quantify the risk of emergence by measuring human movement?

Are the public health organizations ready to control schistosomiasis outbreaks in southern Europe?

15. Holtfreter, M.C. *et al.* (2014) *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Euro Surveill.* 19, pii=20821
16. Boissier, J. *et al.* (2015) Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet* 15, 757–758
17. Boissier, J. *et al.* (2016) Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 971–979
18. Berry, A. *et al.* (2016) Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Euro Surveill.* 21, pii=30100
19. Combes, C. (2001) *Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*, University of Chicago Press
20. Euzet, L. and Combes, C. (1980) Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. *Mémoires Soc. Zool. France* 40, 239–285
21. Quigley, B.J. *et al.* (2012) The mode of host–parasite interaction shapes coevolutionary dynamics and the fate of host cooperation. *Proc. Biol. Sci.* 279, 3742–3748
22. Welter-Schultes, F. (2012) *European Non-Marine Molluscs, a Guide for Species Identification*, Planet Poster Editions
23. Talaván Gómez, J. and Talaván Serna, J. (2006) Notas sobre la malacofauna continental de Murcia y Almería. *Spira* 2, 27–36
24. Perez-Quintero, J.C. *et al.* (2004) Los moluscos de las aguas continentales de la provincia de Huelva. *Iberus* 22, 19–31
25. Martínez-Orti, A. *et al.* (2015) Dos nuevas localizaciones para España de *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) (Gastropoda, Planorbidae), hospedador intermediario de Schistosomiasis urinaria. *Anxius de Miscellània Zoològica* 13, 25–31
26. Bech, M. (1990) Fauna malacológica de Catalunya. Molluscs terrestres i d'aigua dolça. *Treb. Inst. Cat. Hist. Nat.* 12, 1–229
27. Rolán, E. *et al.* (1987) Fauna malacológica de los estuarios–lagoones y sus variaciones por cambios de salinidad. *Iberus* 1, 59–65
28. Doby, J.M. *et al.* (1966) Snails and bilharziasis in Corsica. Distribution, frequency and biology of *Bulinus truncatus*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 41, 337–349
29. Michaud, A. (1829) Physa contorta. *Bull. Soc. Linn. Bordeaux* 3, 268
30. Callot-Girardi, H. (2015) Contribution à la connaissance des mollusques dulcicoles de France. *Avenionia* 152–162
31. Lymbery, A.J. *et al.* (2014) Co-invaders: The effects of alien parasites on native hosts. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildlife* 3, 171–177
32. Rollinson, D. and Simpson, A.J.G. (1987) *The Biology of Schistosomes. From Genes to Latrines*, Academic Press
33. Southgate, V.R. and Agrawal, M.C. (1990) Human schistosomiasis in India? *Parasitol. Today* 6, 166–168
34. Gadgil, R.K. and Shah, S.N. (1952) Human schistosomiasis in India. Discovery of an endemic focus in the Bombay State. *Indian J. Med. Sci.* 6, 760–763
35. Gadgil, R.K. and Shah, S.N. (1955) Human schistosomiasis in India. II. Infection of snails with *Schistosoma haematobium*. *Indian J. Med. Res.* 43, 695–701
36. Semenza, J.C. *et al.* (2014) International dispersal of dengue through air travel: importation risk for Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3278
37. Schlagenhauf, P. *et al.* (2015) Travel-associated infection presenting in Europe (2008–12): an analysis of EuroTravNet longitudinal, surveillance data, and evaluation of the effect of the pre-travel consultation. *Lancet* 15, 55–64
38. Beltrame, A. *et al.* (2016) Schistosomiasis screening of travelers to Corsica, France. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 159–160
39. Gautret, P. *et al.* (2015) Local and international implications of schistosomiasis acquired in Corsica, France. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1865–1868
40. Gautret, P. *et al.* (2016) Schistosomiasis screening of travelers to Corsica, France. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 160–161
41. de Laval, F. *et al.* (2014) Human schistosomiasis: an emerging threat for Europe. *Lancet* 384, 1094–1095
42. Chitsulo, L. *et al.* (2000) The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 77, 41–51
43. Schur, N. *et al.* (2011) Geostatistical model-based estimates of Schistosomiasis prevalence among individuals aged ≤ 20 years in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1194
44. Colley, D.G. *et al.* (2014) Human schistosomiasis. *Lancet* 383, 2253–2264
45. Theron, A. *et al.* (2014) Multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: a new approach of the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. *Infect. Genet. Evol.* 26, 80–88
46. Mittra, G. *et al.* (2012) Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: from field to theory to molecular mechanisms. *Dev. Comp. Immunol.* 37, 1–8
47. Njiokou, F. *et al.* (2004) Experimental study of the compatibility between *Schistosoma haematobium* and two species of *Bulinus* in Cameroon. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 97, 43–46
48. Vera, C. *et al.* (1990) Genetic variability in the compatibility between *Schistosoma haematobium* and its potential vectors in Niger. Epidemiological implications. *Trop. Med. Parasitol.* 41, 143–148
49. Capron, A. *et al.* (1965) Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à *Schistosoma haematobium*. *Bull. WHO* 32, 755–778
50. Xavier, M.L. and de Azevedo, J.F. (1965) Susceptibility of *Planorbium metidjensis* (Forbes) from the south of Portugal (Algarve) and *Bulinus* (Ph.) *africanus* from Portuguese Guinea to *Schistosoma haematobium* from the same overseas province. *Ann. Inst. Med. Trop. (Lisboa)* 22, 57–63
51. Southgate, V.R. *et al.* (1984) Is *Planorbium metidjensis* compatible with *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*? *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 77, 409–506
52. Simoes, M. and De Medeiros, L. (1980) Verificação da susceptibilidade de *Planorbium metidjensis* e *Bulinus contortus* de Portugal ao *Schistosoma haematobium* de Angola. *Garcia de Orta Ser. Zool. Lisboa* 9, 67–70
53. Bettencourt, A. and Borges, I. (1922) Le *Planorbis metidjensis*, hôte intermédiaire du *Schistosoma haematobium* au Portugal. Confirmation expérimentale. *Archives de l'Institut Bactériologie "Camara Pestana" Lisboa* 5, 133–133
54. Moukrim, A. *et al.* (1995) A comparative study of the shedding of cercariae of *Schistosoma haematobium* in newborn *Bulinus truncatus*. *Parasitol. Res.* 81, 537–539
55. Moukrim, A. *et al.* (1996) *Schistosoma haematobium*: influence of the number of miracidia on several characteristics of infection in newborn *Planorbium metidjensis*. *Parasitol. Res.* 82, 267–269
56. Zekhnini, A. *et al.* (1997) *Schistosoma haematobium*: comparative studies on prevalence and cercarial shedding according to the shell diameter of *Planorbium metidjensis* at miracidial exposure. *Parasitol. Res.* 83, 303–305
57. Zekhnini, A. *et al.* (2002) Effect of a short period of desiccation during the patent period on cercarial shedding of *Schistosoma haematobium* from *Planorbium metidjensis*. *Parasitol. Res.* 88, 768–771
58. Yacoubi, B. *et al.* (1999) *Schistosoma haematobium*: comparative studies on the characteristics of infection in three populations of *Planorbium metidjensis* from the Agadir province in South Morocco. *Parasitol. Res.* 85, 239–242
59. Mone, H. *et al.* (1999) The distribution of *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 in relation to intermediate host mollusc–parasite relationships. *Adv. Parasitol.* 44, 99–138
60. Webster, B.L. and Southgate, V.R. (2003) Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology* 127, 231–242
61. Bremond, P. *et al.* (1993) Arguments for the modification of the genome (introgression) of the human parasite *Schistosoma haematobium* by genes from *S. bovis*, in Niger. *C. R. Acad. Sci. III* 316, 667–670
62. Mone, H. *et al.* (2015) Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol. Res.* 114, 4127–4133
63. Huyse, T. *et al.* (2013) Hybridisation between the two major African schistosome species of humans. *Int. J. Parasitol.* 43, 687–689

64. Leger, E. *et al.* (2016) Introgressed animal schistosomes *Schistosoma curassoni* and *S. bovis* naturally infecting humans. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 2212–2214
65. Leger, E. and Webster, J.P. (2017) Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology* 144 (1), 65–80 <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182016001190> Epub 2016 Aug 30. PMID: 27572906
66. King, K.C. *et al.* (2015) Hybridization in parasites: consequences for adaptive evolution, pathogenesis, and public health in a changing world. *PLoS Pathog.* 11, e1005098
67. Stensgaard, A.S. *et al.* (2013) Large-scale determinants of intestinal schistosomiasis and intermediate host snail distribution across Africa: does climate matter? *Acta Trop.* 128, 378–390
68. McCreesh, N. and Booth, M. (2013) Challenges in predicting the effects of climate change on *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* transmission potential. *Trends Parasitol.* 29, 548–555
69. Ittiprasert, W. and Knight, M. (2012) Reversing the resistance phenotype of the *Biomphalaria glabrata* snail host *Schistosoma mansoni* infection by temperature modulation. *PLoS Pathog.* 8, e1002677
70. Simoonga, C. *et al.* (2009) Remote sensing, geographical information system and spatial analysis for schistosomiasis epidemiology and ecology in Africa. *Parasitology* 136, 1683–1693
71. Manyangadze, T. *et al.* (2016) Modelling the spatial and seasonal distribution of suitable habitats of schistosomiasis intermediate host snails using Maxent in Ndumo area, KwaZulu-Natal Province, South Africa. *Parasites Vectors* 9, 572
72. Bass, D. *et al.* (2015) Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends Parasitol.* 31, 499–513
73. Bohmann, K. *et al.* (2014) Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.* 29, 358–367
74. Huver, J.R. *et al.* (2015) Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecol. Appl.* 25, 991–1002
75. Schets, F.M. *et al.* (2010) Confirmation of the presence of *Trichobilharzia* by examination of water samples and snails following reports of cases of cercarial dermatitis. *Parasitology* 137, 77–83
76. Schneider, J. *et al.* (2016) Detection of invasive mosquito vectors using environmental DNA (eDNA) from water samples. *PLoS One* 11, e0162493
77. Hartikainen, H. *et al.* (2016) Assessing myxozoan presence and diversity using environmental DNA. *Int. J. Parasitol.* 46, 781–792
78. Stothard, J.R. *et al.* (2017) Towards interruption of schistosomiasis transmission in sub-Saharan Africa: developing an appropriate environmental surveillance framework to guide and to support ‘end game’ interventions. *Infect. Dis. Poverty* 6, 10
79. Rowan, W.B. (1964) Sewage treatment and schistosome eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13, 572–576
80. Brady, O.J. *et al.* (2013) Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasites Vectors* 6, 351
81. Whitty, C.J. *et al.* (2000) Presentation and outcome of 1107 cases of schistosomiasis from Africa diagnosed in a non-endemic country. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 531–534
82. Bierman, W.F. *et al.* (2005) Presentation and diagnosis of imported schistosomiasis: relevance of eosinophilia, microscopy for ova, and serology. *J. Travel Med.* 12, 9–13
83. Meltzer, E. *et al.* (2006) Schistosomiasis among travelers: new aspects of an old disease. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1696–1700
84. Van Gool, T. *et al.* (2002) Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with *S. mansoni* egg antigens. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3432–3437
85. Jaureguiberry, S. *et al.* (2010) Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 225–231

Annexe 1

Tableau A1: Compatibilité entre *S. haematobium* et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		<i>S. haematobium</i>				
Jour		20	28	35	42	49
<i>B. t</i> Cameroun n=71	M	7%	7%	15%	15%	51%
	P	0%	9%	3%	2%	0%
<i>B. t</i> Corse n=18	M	0%	11%	11%	17%	17%
	P	0%	0%	0%	0%	0%
<i>B. t</i> Espagne n=328	M	8%	20%	33%	39%	47%
	P	0%	9%	11%	5%	4%
<i>P. m</i> Espagne n=24	M	0%	0%	0%	0%	0%
	P	0%	0%	0%	0%	0%

Tableau A2: Compatibilité entre *S. bovis* et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		<i>S. bovis</i>				
Jour		20	28	35	42	49
<i>B. t</i> Cameroun n=36	M	3%	11%	36%	44%	44%
	P	57%	72%	61%	55%	55%
<i>B. t</i> Corse n=70	M	0%	17%	20%	27%	34%
	P	3%	90%	91%	98%	100%
<i>B. t</i> Espagne n=24	M	3%	3%	27%	30%	36%
	P	3%	81%	92%	96%	95%
<i>P. m</i> Espagne n=33	M	37%	40%	50%	50%	53%
	P	47%	56%	60%	60%	57%

Tableau A3: Compatibilité entre hybride Corse (Sh x Sb) et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		Hybride Corse (Sh x Sb)				
Jour		20	28	35	42	49
<i>B. t</i> Cameroun n=35	M	6%	6%	11%	14%	14%
	P	0%	0%	0%	0%	0%
<i>B. t</i> Corse n=40	M	5%	8%	8%	13%	15%
	P	0%	3%	24%	20%	18%
<i>B. t</i> Espagne n=36	M	3%	6%	6%	6%	6%
	P	0%	3%	15%	15%	18%
<i>P. m</i> Espagne n=40	M	25%	28%	30%	38%	38%
	P	0%	0%	0%	0%	0%

Tableau A4: Compatibilité entre F1 et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		F1				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=144	M	8%	14%	16%	26%	33%
	P	0%	41%	40%	30%	26%
B. t Corse n=153	M	11%	18%	25%	33%	38%
	P	0%	26%	23%	20%	11%
B. t Espagne n=120	M	33%	48%	48%	61%	69%
	P	0%	68%	70%	70%	62%
P. m Espagne n=36	M	0%	6%	8%	19%	33%
	P	0%	15%	24%	24%	17%

Tableau A5: Compatibilité entre F1' et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		F1'				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=144	M	14%	22%	26%	33%	41%
	P	32%	35%	34%	27%	9%
B. t Corse n=168	M	4%	8%	18%	32%	43%
	P	8%	46%	47%	41%	22%
B. t Espagne n=96	M	15%	22%	29%	36%	66%
	P	63%	88%	87%	82%	64%
P. m Espagne n=34	M	24%	35%	47%	53%	68%
	P	8%	9%	6%	0%	0%

Tableau A6: Résultats de compatibilité entre F2 et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		F2				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=30	M	0%	0%	0%	0%	3%
	P	0%	30%	30%	30%	31%
B. t Corse n=30	M	10%	10%	10%	10%	10%
	P	0%	56%	63%	63%	74%
B. t Espagne n=30	M	0%	3%	7%	13%	17%
	P	0%	52%	57%	58%	56%
P. m Espagne n=0	M	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-

Tableau A7: Résultats de compatibilité entre F2' et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		F2'				
Jour		20	28	35	42	49
<i>B. t</i> Cameroun n=30	M	0%	0%	0%	0%	10%
	P	7%	37%	37%	37%	33%
<i>B. t</i> Corse n=30	M	3%	3%	10%	10%	20%
	P	0%	59%	56%	59%	54%
<i>B. t</i> Espagne n=30	M	0%	3%	13%	13%	27%
	P	0%	38%	42%	46%	36%
<i>P. m</i> Espagne n=0	M	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-

Tableau A8: Résultats de compatibilité entre ♀ F1' x ♂ Sh et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		♀ F1' x ♂ Sh				
Jour		20	28	35	42	49
<i>B. t</i> Cameroun n=48	M	8%	29%	44%	52%	54%
	P	0%	0%	7%	4%	9%
<i>B. t</i> Corse n=48	M	0%	0%	2%	10%	17%
	P	0%	15%	19%	23%	18%
<i>B. t</i> Espagne n=48	M	13%	25%	31%	38%	38%
	P	0%	14%	33%	37%	30%
<i>P. m</i> Espagne n=24	M	0%	0%	0%	0%	0%
	P	0%	0%	0%	0%	0%

Tableau A9: Résultats de compatibilité entre ♀ F1 x ♂ Sh et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		♀ F1 x ♂ Sh				
Jour		20	28	35	42	49
<i>B. t</i> Cameroun n=48	M	2%	2%	4%	4%	13%
	P	0%	4%	11%	11%	7%
<i>B. t</i> Corse n=48	M	2%	4%	4%	4%	6%
	P	0%	7%	7%	7%	4%
<i>B. t</i> Espagne n=48	M	0%	0%	0%	6%	10%
	P	0%	52%	52%	56%	53%
<i>P. m</i> Espagne n=24	M	13%	13%	13%	13%	17%
	P	0%	5%	5%	5%	5%

Tableau A10: Résultats de compatibilité entre ♀ F1' x ♂ Sb et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		♀ F1' x ♂ Sb				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=27	M	0%	4%	15%	19%	19%
	P	48%	50%	43%	41%	41%
B. t Corse n=35	M	3%	6%	23%	31%	40%
	P	59%	85%	81%	71%	67%
B. t Espagne n=24	M	4%	8%	21%	21%	21%
	P	4%	82%	84%	84%	84%
P. m Espagne n=15	M	0%	7%	13%	13%	13%
	P	13%	29%	31%	46%	62%

Tableau A11: Résultats de compatibilité entre ♀ F1 x ♂ Sb et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		♀ F1 x ♂ Sb				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=48	M	4%	6%	19%	31%	31%
	P	0%	58%	54%	45%	45%
B. t Corse n=48	M	6%	6%	13%	21%	31%
	P	2%	73%	71%	68%	64%
B. t Espagne n=48	M	13%	31%	38%	46%	53%
	P	2%	30%	57%	46%	41%
P. m Espagne n=18	M	6%	6%	11%	17%	17%
	P	0%	0%	6%	20%	20%

Tableau A12: Résultats de compatibilité entre ♂ F1' x ♀ Sb et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		♂ F1' x ♀ Sb				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=48	M	0%	4%	4%	10%	13%
	P	8%	63%	65%	74%	64%
B. t Corse n=48	M	0%	4%	13%	48%	69%
	P	0%	93%	98%	96%	93%
B. t Espagne n=48	M	0%	2%	10%	46%	71%
	P	2%	83%	91%	88%	79%
P. m Espagne n=18	M	17%	17%	22%	28%	39%
	P	47%	73%	79%	85%	82%

Tableau A13: Résultats de compatibilité entre ♂ F1 x ♀ Sb et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		♂ F1 x ♀ Sb				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=48	M	13%	13%	19%	42%	44%
	P	29%	55%	51%	25%	26%
B. t Corse n=48	M	4%	8%	25%	48%	58%
	P	15%	82%	78%	68%	60%
B. t Espagne n=48	M	13%	21%	27%	33%	40%
	P	19%	61%	69%	72%	66%
P. m Espagne n=0	M	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-

Tableau A14: Résultats de compatibilité entre ♂ F1' x ♀ Sh et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

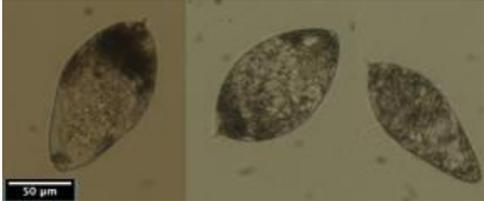
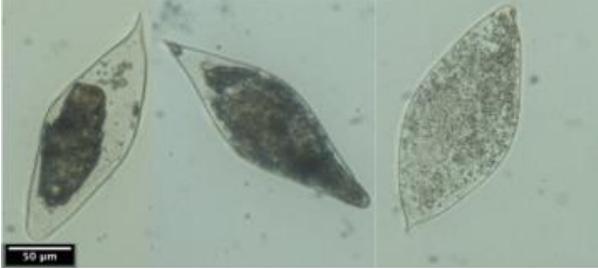
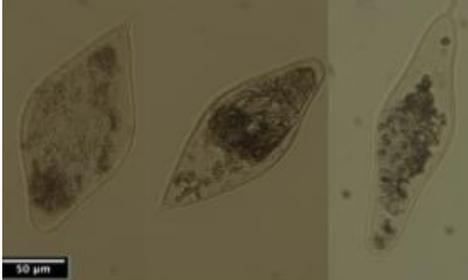
		♂ F1' x ♀ Sh				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=48	M	6%	17%	17%	21%	25%
	P	0%	10%	20%	16%	11%
B. t Corse n=48	M	6%	17%	21%	31%	40%
	P	0%	20%	42%	33%	31%
B. t Espagne n=48	M	0%	0%	6%	23%	27%
	P	0%	50%	56%	57%	51%
P. m Espagne n=5	M	0%	0%	0%	20%	40%
	P	0%	20%	20%	25%	33%

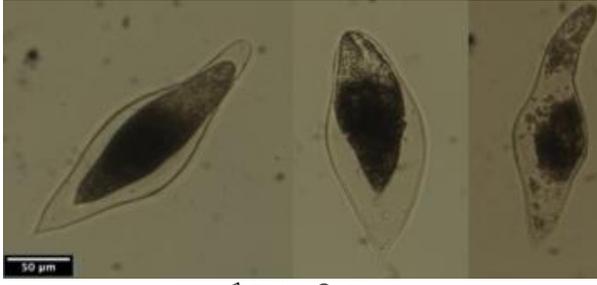
Tableau A15: Résultats de compatibilité entre ♂ F1 x ♀ Sh et mollusques hôtes intermédiaires d'espèces et de localités différentes. n = nombre de mollusques initialement exposés au parasite, M: mortalité; P: prévalence.

		♂ F1 x ♀ Sh				
Jour		20	28	35	42	49
B. t Cameroun n=41	M	2%	5%	10%	15%	15%
	P	0%	15%	11%	11%	11M
B. t Corse n=40	M	0%	0%	0%	0%	0%
	P	0%	0%	0%	3%	3%
B. t Espagne n=40	M	3%	3%	5%	15%	25%
	P	0%	56%	61%	62%	53%
P. m Espagne n=0	M	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-

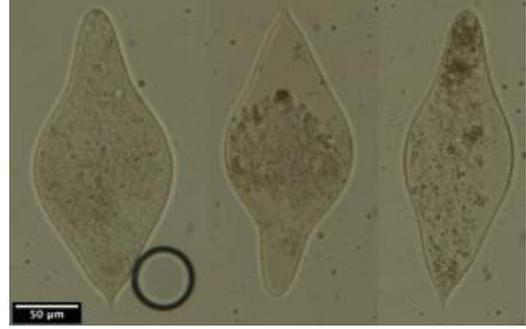
Annexe 2

Tableau 1: Photographies des œufs des espèces parentales comparées aux hybrides (échelle = 50 µm).

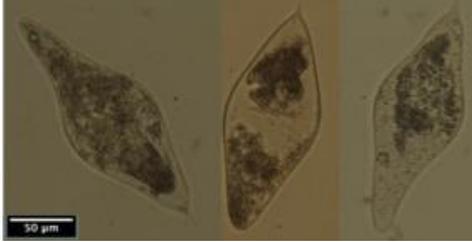
 <p><i>S. bovis</i></p>	 <p><i>S. haematobium</i></p>
 <p>Hybride Corse (Sh x Sb)</p>	 <p>F1</p>
 <p>F1'</p>	 <p>♀ F1 x ♂ Sh</p>
 <p>♂ F1 x ♀ Sh</p>	 <p>♀ F1 x ♂ Sb</p>
 <p>♂ F1 x ♀ Sb</p>	 <p>♀ F1' x ♂ Sh</p>



♂ F1' x ♀ Sh



♀ F1' x ♂ Sb



♂ F1' x ♀ Sb

Références

- Abajobir, A.A. et al., 2017. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), pp.1260–1344.
- Adams, K.L. & Wendel, J.F., 2005. Allele-specific, bidirectional silencing of an alcohol dehydrogenase gene in different organs of interspecific diploid cotton hybrids. *Genetics*, 171(4), pp.2139–2142.
- Aldhebiani, A.Y., 2018. Species concept and speciation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3), pp.437–440. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.04.013>.
- Alves, W., 1948. The Eggs of *Schistosoma bovis*, *S. mattheei* and *S. haematobium*. *Journal of Helminthology*, 23(3–4), pp.127–134. Available at: <https://www.cambridge.org/core/article/eggs-of-schistosoma-bovis-s-mattheei-and-s-haematobium/A88CC163F1DA24308A44FA9FBB6969A0>.
- Anderson, E., 1948. Hybridization of the Habitat. *Evolution*, 2(1), p.1. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2405610?origin=crossref>.
- Anderson, E. & Hubricht, L., 1938. Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany*, pp.396–402.
- Anderson, R., Parasitology, R.M.- & 1982, undefined, 1982. Coevolution of hosts and parasites. *Cambridge.Org*, pp.411–426. Available at: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/coevolution-of-hosts-and-parasites/AD3B9037962266A448DF14786AB1D6F8>.
- Arnold, M.L., 2004. Natural hybridization and the evolution of domesticated, pest and disease organisms. *Molecular Ecology*, 13(5), pp.997–1007.
- Arnold, M.L. & Martin, N.H., 2009. Adaptation by introgression. *Journal of Biology*, 8(9), pp.9–11.
- De Azevedo, J.F. et al., 1948. O foco Português de schistosomíase. *An Inst Med Trop (Lisb)*, 5, pp.175–221.
- Baack, E.J. & Rieseberg, L.H., 2007. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(6), pp.513–518. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X07001669>.
- Baack, E.J., Whitney, K.D. & Rieseberg, L.H., 2005. Hybridization and genome size evolution: Timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. *New Phytologist*, 167(2), pp.623–630.
- Bar-Zvi, D. et al., 2017. Hybrid vigor: The best of both parents, or a genomic clash? *Current Opinion in Systems Biology*, 6, pp.22–27. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.coisb.2017.08.004>.

- Barakat, R.M.R., 2013. Epidemiology of Schistosomiasis in Egypt: Travel through Time: Review. *Journal of Advanced Research*, 4(5), pp.425–432. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2012.07.003>.
- Baranwal, V.K. et al., 2012. Heterosis: emerging ideas about hybrid vigour. *Journal of experimental botany*, 63(18), pp.6309–6314.
- Barton, N.H., 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular ecology*, 10(3), pp.551–568.
- Basch, P.F., 1991. Schistosomes: development, reproduction, and host relations.
- Basch, P.F., 1990. Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitology Today*, 6(5), pp.160–163.
- Bech, M., 1990. *Fauna malacològica de Catalunya: mol·luscs terrestres i d'aigua dolça*, Institut d'Estudis Catalans.
- Becker, M. et al., 2013. Hybridization may facilitate in situ survival of endemic species through periods of climate change. *Nature Climate Change*, 3(12), pp.1039–1043. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nclimate2027>.
- Beltran, S. & Boissier, J., 2008. Schistosome monogamy: who, how, and why? *Trends in Parasitology*, 24(9), pp.386–391.
- Bennett, J.L. et al., 1997. The development of resistance to anthelmintics: A perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Experimental Parasitology*, 87(3), pp.260–267.
- Berry, A. et al., 2016. Evidence for a permanent presence of Schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Eurosurveillance*, 21(1), pp.5–8.
- Berry, A. et al., 2014. Schistosomiasis Haematobium, Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20(9), pp.1595–1597. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4178424/>.
- Bilharz, T., 1853. Further observations concerning Distomum haematobium in the portal vein of man and its relationship to certain pathological formations with brief notes by Seibald. *Z Wiss Zool*, 4, p.72.
- Birchler, J.A., 2003. In Search of the Molecular Basis of Heterosis. *the Plant Cell Online*, 15(10), pp.2236–2239. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.151030>.
- Birchler, J.A., Yao, H. & Chudalayandi, S., 2006. Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), pp.12957–12958.
- Blum, A.J. & Hotez, P.J., 2018. Global “worming”: Climate change and its projected general impact on human helminth infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), pp.8–

13.

- Boissier, J. et al., 2016. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(16), pp.1–9. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916001754>.
- Boissier, J. et al., 2003. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 91(2), pp.144–150.
- Boissier, J. et al., 2015. Schistosomiasis reaches Europe. *The Lancet. Infectious diseases*, 15(7), pp.757–8. Available at: <http://www.thelancet.com/article/S1473309915000845/fulltext> [Accessed June 8, 2016].
- Boissier, J., Durand, P. & Moné, H., 2001. *PCR effectiveness for sexing Schistosoma mansoni cercariae: application for sexing clonal cercarial populations*,
- Boissier, J., Rivera, E.R. & Moné, H., 2003. Altered behavior of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. *The Journal of parasitology*, 89(3), pp.429–433.
- De Bont, J. et al., 1994. Cattle schistosomiasis in Zambia. *Journal of Helminthology*, 68(4), pp.295–299. Available at: <https://www.cambridge.org/core/article/cattle-schistosomiasis-in-zambia/978EDB970493579DC66FA24B9ABF52EB>.
- De Bont, J. & Vercruyse, J., 1997. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitology Today*, 13(7), pp.255–262.
- BOON, N.A.M. et al., 2018. Barcoding hybrids: heterogeneous distribution of *Schistosoma haematobium* × *Schistosoma bovis* hybrids across the Senegal River Basin. *Parasitology*, pp.1–12.
- BOON, N.A.M. et al., 2017. Detecting hybridization in African schistosome species: does egg morphology complement molecular species identification? *Parasitology*, 144(7), pp.954–964. Available at: <https://www.cambridge.org/core/article/detecting-hybridization-in-african-schistosome-species-does-egg-morphology-complement-molecular-species-identification/8491AB90421907126BC168D4650D5E15>.
- Bouzid, M. et al., 2014. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. *BMC public health*, 14, p.781. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4143568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brasier, C.M., Cooke, D.E.L. & Duncan, J.M., 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), pp.5878–5883.
- Bremond, P. et al., 1993. [Arguments for the modification of the genome (introgression) of the human parasite *Schistosoma haematobium* by genes from *S. bovis*, in Niger]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 316(7), pp.667–670.

- Brémond, P. et al., 1993. Arguments for the modification of the genome (introgression) of the human parasite *Schistosoma haematobium* by genes from *S. bovis*, in Niger. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 316(7), pp.667–670.
- Brumpt, E., 1930. Cycle évolutif complet de *Schistosoma bovis*-Infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bullinus contortus*. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 8(1), pp.17–50.
- Brumpt, E., 1928. Réalisation expérimentale du cycle complet du *Schistosoma haematobium*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 6(4), pp.440–446.
- Bull, V. et al., 2006. Polyphyly and gene flow between non-sibling *Heliconius* species. *BMC Biology*, 4, pp.1–17.
- Burchard, G.D. & Kern, P., 1985. Probable hybridization between *S. intercalatum* and *S. haematobium* in western Gabon. *Tropical and geographical medicine*, 37(2), pp.119–123. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4035773>.
- Bushara, H.O. et al., 1980. Observations on Cattle Schistosomiasis in the Sudan, a Study in Comparative Medicine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(3).
- Calvo-Cano, A. et al., 2015. A Case of Urogenital Human Schistosomiasis from a Non-endemic Area. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), pp.3–6.
- Capron, A., Deblock, S., Biguet, J., Clay, A., Adenis, L. & Vernes, A., 1965. Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à *Schistosoma haematobium*. *Bulletin of the World Health Organization*, 32(6), p.755.
- Catalano, S. et al., 2018. Rodents as Natural Hosts of Zoonotic *Schistosoma* Species and Hybrids: An Epidemiological and Evolutionary Perspective From West Africa. *The Journal of Infectious Diseases*, p.jiy029. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiy029>.
- Cheever, A.W. et al., 1994. Kinetics of Egg Production and Egg Excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in Mice Infected with a Single Pair of Worms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(3).
- Chen, Z.J., 2013. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nature Reviews Genetics*, 14(7), pp.471–482.
- Chen, Z.J., 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science*, 15(2), pp.57–71.
- Chevalier, F.D. et al., 2016. *Real-time PCR for sexing Schistosoma mansoni cercariae*,
- Chitsulo, L. et al., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77(1), pp.41–51.
- Cioli, D. et al., 2014. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(1), pp.23–29. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016685114000759>.

- Colley, D.G. et al., 2014. Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)*, 383(9936), pp.2253–2264. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4672382/>.
- Combes, C., 1991. The schistosome scandal. *Acta Oecologica*, 12(1), pp.165–173.
- Crompton, D.W.T., 2006. *Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers*, World Health Organization.
- Darwin, C., 1877. The Effects of Cross and Self Fertilisation in the Vegetable Kingdom. *Nature*, 15(381), pp.329–332.
- Davis, A. & Bailey, D.R., 1969. Metrifonate in urinary schistosomiasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 41(2), pp.209–224.
- van Delft, F. et al., 2007. Cough and alterations in semen after a tropical swim. *Netherlands Journal of Medicine*, 65(8), pp.304–306.
- Detwiler, J.T. & Criscione, C.D., 2010. An infectious topic in reticulate evolution: Introgression and hybridization in animal parasites. *Genes*, 1(1), pp.102–123.
- Doby, J.M. et al., 1966. [Snails and bilharziasis in Corsica. Distribution, frequency and biology of “*Bulinus truncatus*”]. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 41(4), pp.337–349.
- Doherty, J.F., Moody, A.H. & Wright, S.G., 1996. Lesson of the Week: Katayama fever: An acute manifestation of schistosomiasis. *Bmj*, 313(7064), pp.1071–1072.
- Dowling, T.E. & DeMaris, B.D., 1993. Evolutionary significance of introgressive hybridization in cyprinid fishes. *Nature*, 362(6419), pp.444–446.
- Duvick, D.N., 1999. Heterosis: feeding people and protecting natural resources. *The genetics and exploitation of heterosis in crops*, pp.19–29.
- Engels, D. et al., 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica*, 82(2), pp.139–146.
- Feldmeier, H., Krantz, I. & Poggensee, G., 1994. Female Genital Schistosomiasis as a Risk-Factor for the Transmission of HIV. *International Journal of STD & AIDS*, 5(5), pp.368–372. Available at: <https://doi.org/10.1177/095646249400500517>.
- Fenwick, A. & Jourdan, P., 2015. Schistosomiasis elimination by 2020 or 2030? *International Journal for Parasitology*, (February), pp.20–23. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.01.004>.
- Gasser, R.B., Morahan, G. & Mitchell, G.F., 1991. Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 47(2), pp.255–258. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016668519190187B> [Accessed June 8, 2016].
- Gautret, P. et al., 2012. Infectious diseases among travellers and migrants in Europe,

Eurotravnet 2010. *Eurosurveillance*, 17(26).

Goff, S.A., 2011. A unifying theory for general multigenic heterosis: Energy efficiency, protein metabolism, and implications for molecular breeding. *New Phytologist*, 189(4), pp.923–937. Available at:

<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=21166808&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1111/j.1469-8137.2010.03574.x>.

GÓMEZ, J.T. & SERNA, J.T., 2006. Notas sobre la malacofauna continental de Murcia y Almería. *Spira*, 2, pp.27–36.

Le Govic Yohann et al., Hybrids Between *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* Parasites Infecting a Migrant.

Grant, P.R. & Grant, B.R., 1997. Hybridization, Sexual Imprinting, and Mate Choice. *The American Naturalist*, 149(1), pp.1–28. Available at:
<http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/285976>.

Grant, P.R. & Grant, B.R., 1992. Hybridization of Bird Species. *Science*, 256(April), pp.193–197. Available at:
<http://search.proquest.com/openview/71d4cbbdbfb330a5062d61cfde2e7c12/1?pq-origsite=gscholar>.

Gretillat, S., 1963. Epidémiologie de certaines affections à Trématodes des animaux domestiques en Corse (Bilharziose bovine et Distomatose bovine et ovine). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 38(3), pp.471–481. Available at:
<https://doi.org/10.1051/parasite/1963383471>.

Grobusch, M.P. et al., 1999. Imported schistosomiasis in Europe: sentinel surveillance data from TropNetEurop. *Journal of travel medicine*, 10(3), pp.164–169.

Grossman, a I., Short, R.B. & Cain, G.D., 1981. Karyotype evolution and sex chromosome differentiation in Schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae). *Chromosoma*, 84(3), pp.413–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7327052>.

Gryseels, B. et al., 2006. Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)*, 368(9541), pp.1106–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997665>.

Gryseels, B., 2012. Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), pp.383–397. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089155201200013X>.

Guo, M. et al., 2003. Genome-wide mRNA profiling reveals heterochronic allelic variation and a new imprinted gene in hybrid maize endosperm. *Plant Journal*, 36(1), pp.30–44.

Ha, M. et al., 2009. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), pp.17835–17840. Available at:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0907003106>.

- Hedrick, P.W., 2013. Adaptive introgression in animals: Examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular Ecology*, 22(18), pp.4606–4618.
- Hinz, R. et al., 2017. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis – A review. *Molecular and Cellular Probes*, 31, pp.2–21. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2016.12.003>.
- Hochholdinger, F. & Hoecker, N., 2007. Towards the molecular basis of heterosis. *Trends in Plant Science*, 12(9), pp.427–432.
- Holtfreter, M.C. et al., 2014. Schistosoma haematobium infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Eurosurveillance*, 19(22).
- Hotez, P.J. et al., 2007. Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine*, 357(10), pp.1018–1027.
- Hotez, P.J. et al., 2009. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *The Lancet*, 373(9674), pp.1570–1575. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60233-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60233-6).
- Hotez, P.J. et al., 2014. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7).
- Hua, J. et al., 2003. Single-locus heterotic effects and dominance by dominance interactions can adequately explain the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), pp.2574–2579. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0437907100>.
- Huyse, T. et al., 2009. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathogens*, 5(9).
- Huyse, T. et al., 2013. Hybridisation between the two major African schistosome species of humans. *International Journal for Parasitology*, 43(8), pp.687–689. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.001>.
- Johansen, M. V et al., 1996. Experimental Schistosoma bovis Infection in Goats : Pathological Consequences of Praziquantel Treatment. , 115(1990), pp.1–11.
- Johnston, J.A., Arnold, M.L. & Donovan, L.A., 2012. High hybrid fitness at seed and seedling life history stages in Louisiana irises. , 91(3), pp.438–446.
- Jourdane, J., Imbert-Establet, D. & Tchuente, L.A.T., 1995. Parthenogenesis in schistosomatidae. *Parasitology Today*, 11(11), pp.427–430.
- Kim, K.-H., Kabir, E. & Ara Jahan, S., 2014. A review of the consequences of global climate change on human health. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, 32(3), pp.299–318. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226222>.
- Kincaid-Smith, J. et al., 2016. A Genome Wide Comparison to Identify Markers to

- Differentiate the Sex of Larval Stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their Respective Hybrids. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(11), p.e0005138. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005138>.
- Kincaid-Smith, J. et al., 2017. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. *Trends in Parasitology*, 33(8), pp.600–609. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.009>.
- Kincaid-Smith, J. et al., 2018. Whole genome sequencing and morphological analysis of the human-infecting schistosome emerging in Europe reveals a complex admixture between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites. *bioRxiv*. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/08/11/387969>.
- King, C.H., 2010. Parasites and poverty: The case of schistosomiasis. *Acta Tropica*, 113(2), pp.95–104.
- King, C.H., Muchiri, E.M. & Ouma, J.H., 2000. Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. *Emerging Infectious Diseases*, 6(6), pp.585–594.
- King, K.C. et al., 2015. Hybridization in Parasites: Consequences for Adaptive Evolution, Pathogenesis, and Public Health in a Changing World. *PLoS Pathogens*, 11(9), pp.1–12.
- Kinkel, H.F. et al., 2012. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(6), pp.948–953.
- Kirchner, J.W. & Roy, B.A., 2002. Evolutionary implications of host-pathogen specificity: Fitness consequences of pathogen virulence traits. *Evolutionary Ecology Research*, 4(1), pp.27–48.
- Kjetland, E.F., Leutscher, P.D.C. & Ndhlovu, P.D., 2016. A review of female genital schistosomiasis. *Trends in Parasitology*, 28(2), pp.58–65. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.008>.
- Kovach, R.P. et al., 2016. Risk and efficacy of human-enabled interspecific hybridization for climate-change adaptation: Response to Hamilton and Miller (2016). *Conservation Biology*, 30(2), pp.428–430.
- Kusel, J. & Hagan, P., 1999. Praziquantel - Its use, cost and possible development of resistance. In *Parasitology Today*. pp. 352–354. Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=10461159>.
- Lawton, S.P. et al., 2011. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasites & vectors*, 4(1), p.131. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79960023624&partnerID=tZOtx3y1>.
- Léger, E. et al., 2016. Introgressed Animal Schistosomes *Schistosoma curassoni* and *S. bovis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(12), pp.2212–2215.

- Léger, E. & Webster, J.P., 2016. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology*, pp.1–16. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182016001190.
- Leiper, R.T., 1915. Report on the Results of the Bilharzia Mission in Egypt, 1915. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 25(1; 2), pp.1–191.
- Li, Y.L. et al., 1996. Circulating antigens in schistosomiasis: Detection of 31/32-kDa proteins in sera from patients infected with *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, or *S. intercalatum*. *Parasitology Research*, 82(1), pp.14–18.
- Lingscheid, T. et al., 2017. Schistosomiasis in European Travelers and Migrants: Analysis of 14 Years TropNet Surveillance Data. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 97(2), pp.567–574.
- Lippman, Z.B. & Zamir, D., 2007. Heterosis: revisiting the magic. *Trends in Genetics*, 23(2), pp.60–66.
- Loker, E.S., 1983. A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology*, 87(2), pp.343–369.
- Loker, E.S. & Brant, S. V., 2006. Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends in Parasitology*, 22(11), pp.521–528.
- Lu, D.B. et al., 2018. Single-sex schistosome infections of definitive hosts: Implications for epidemiology and disease control in a changing world. *PLoS Pathogens*, 14(3), pp.1–7.
- Machado, C.A. & Ayala, F.J., 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), pp.7396–7401.
- Mallet, J., 2007. Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133), pp.279–283.
- Mallet, J., 2008. Hybridization, ecological races and the nature of species: Empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1506), pp.2971–2986.
- Mallet, J., 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(5), pp.229–237.
- Martínez-Ortí, A., Bargues, M.D. & Mas-Coma, S., 2015. Dos nuevas localizaciones para España de *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827)(Gastropoda, Planorbidae), hospedador intermediario de Schistosomiasis urinaria. *Arxius de Miscel·lània Zoològica*, 1, pp.25–31.
- Martinsen, G.D. et al., 2001. Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution*, 55(7), pp.1325–1335. Available at: <http://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00655.x>.
- Mavárez, J. et al., 2006. Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. *Nature*, 441(7095), pp.868–871.

- Mayr, E., 1963. *Animal Species and Evolution.* (Belknap Press of Harvard University: Cambridge, IL.).
- Mayr, E., 1942. "Systematics and the Origin of Species" excerpt. In *Systematics and the Origin of Species*.
- McClintock, B., 1984. The significance of response of the genome to challenge. *Science*, 226(4676), pp.792–801. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/226/4676/792.abstract>.
- McManus, D.P. & Loukas, A., 2008. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), pp.225–242.
- Moné, H. et al., 2015. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitology Research*, 114(11), pp.4127–4133.
- Moné, H. et al., 2012. Natural interactions between *S. haematobium* and *S. guineensis* in the Republic of Benin. *The Scientific World Journal*, 2012, p.793420. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84862315116&partnerID=tZOtx3y1>.
- Moné, H. & Boissier, J., 2004. Sexual biology of schistosomes. *Advances in Parasitology*, 57(04), pp.89–189.
- Moné, H., Mouahid, G. & Morand, S., 1999. *The Distribution of Schistosoma bovis Sonsino, 1876 in Relation to Intermediate Host Mollusc–Parasite Relationships*, England.
- MONRAD, J. et al., 2006. Treatment efficacy and regulatory host responses in chronic experimental *Schistosoma bovis* infections in goats. *Parasitology*, 133(2), pp.151–158. Available at: <https://www.cambridge.org/core/article/treatment-efficacy-and-regulatory-host-responses-in-chronic-experimental-schistosoma-bovis-infections-in-goats/D023C87D742BD108626A30A505CFD346>.
- Morgan, J. a T. et al., 2003. First report of a natural hybrid between *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. *The Journal of parasitology*, 89(2), pp.416–418.
- Moukrim, A., Zekhnini, A. & Rondelaud, D., 1995. A comparative study of the shedding of cercariae of *Schistosoma haematobium* in newborn *Bulinus truncatus*. *Parasitology research*, 81(6), pp.537–539.
- Moukrim, A., Zekhnini, A. & Rondelaud, D., 1996. *Schistosoma haematobium*: influence of the number of miracidia on several characteristics of infection in newborn *Planorbium metidjensis*. *Parasitology research*, 82(3), pp.267–269.
- Muirhead, C.A. & Presgraves, D.C., 2016. Hybrid Incompatibilities, Local Adaptation, and the Genomic Distribution of Natural Introgression between Species. *The American Naturalist*, 187(2), pp.249–261. Available at: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/684583>.
- Murare, H.M. & Doenhoff, M.J., 1987. Parasitological observations of *Schistosoma bovis* in

- normal and T-cell deprived mice. , pp.507–516.
- Mutani, A., Christensen, N.Ø. & Frandsen, F., 1983. Studies on the relationship between *Schistosoma* and their intermediate hosts. *Parasitology Research*, 69(4), pp.483–487.
- Njiokou, F., Teukeng, F. & Njiné, T., 2004. Etude expérimentale de la compatibilité entre *Schistosoma haematobium* et deux espèces de bulinus au Cameroun.
- Noël, H. et al., 2018. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clinical Microbiology and Infection*, 24(3), pp.295–300. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.026>.
- Nunn, J.F. & Tapp, E., 2000. Tropical diseases in ancient Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(2), pp.147–153.
- Pages, J.R. & Théron, A., 1990. Analysis and comparison of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis*, and their hybrid progeny. *International Journal for Parasitology*, 20(2), pp.193–197.
- Payseur, B.A., Krenz, J.G. & Nachman, M.W., 2004. Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution*, 58(9), pp.2064–2078.
- Pérez-Quintero, J.C., Bech, M. & Huertas, J.L., 2004. Los moluscos de las aguas continentales de la provincia de Huelva (SO España). *Iberus*, 22(2), pp.19–31.
- Pitchford, R.J., 1977. A check list of definitive hosts exhibiting evidence of the genus *Schistosoma* weinland, 1858 acquired naturally in Africa and the middle east. *Journal of Helminthology*, 51(3), pp.229–251.
- Pitchford, R.J., 1965. Differences in the Egg Morphology and Certain Biological Characteristics of Some African and Middle Eastern *Schistosoma*, Genus *Schistosoma*, with Terminal-Spined Eggs. *Bulletin of the World Health Organization*, 32, pp.105–120.
- Pitchford, R.J., 1961. Observations on a possible hybrid between the two schistosomes *S. haematobium* and *S. mattheei*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(1), pp.44–51.
- Pitchford, R.J. & Lewis, M., 1978. Oxamniquine in the treatment of various schistosome infections in South Africa. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 53(October 1977), pp.677–680.
- Popiel, I., 1986. Male-stimulated female maturation in *Schistosoma*: A review. *Journal of Chemical Ecology*, 12(8), pp.1745–1754. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01022380>.
- Popiel, I., Cioli, D. & Erasmus, D.A., 1984. The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *International Journal for Parasitology*, 14(2), pp.183–190. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075198490047X>.

- Portela, J. et al., 2010. Whole-genome in-silico subtractive hybridization (WISH)--using massive sequencing for the identification of unique and repetitive sex-specific sequences: the example of *Schistosoma mansoni*. *BMC genomics*, 11, p.387.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), pp.879–886.
- Ramajo Martín, V., 1972. Contribución al estudio epizootiológico de la esquistosomiasis bovina (*Schistosoma bovis*) en la provincia de Salamanca. *Revista Ibérica de Parasitología*, 32(3–4), pp.207–242. Available at: http://bibliotecavirtual.ranf.com/i18n/catalogo_imagenes/imagen_id.cmd?idImagen=10002312%5Cnhttp://bibliotecavirtual.ranf.com/i18n/consulta_registro.cmd?id=12657.
- Ramalli, L. et al., 2018. Persistence of schistosomal transmission linked to the cavu river in southern Corsica since 2013. *Eurosurveillance*, 23(4), pp.2–5.
- Rhymer, J.M. & Simberloff, D., 1996. Extinction by Hybridization and Introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27, pp.83–109. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2097230>.
- Richard-Lenoble, D. et al., 1993. Bilharziasis caused by *Schistosoma intercalatum*, a recent and forgotten form of schistosomiasis. *La Revue du praticien*, 43(4), pp.432–439.
- Rieseberg, L.H. et al., 2003. Major ecological transitions in wild sunflower facilitated by hybridization. *Science*, 301(August), pp.1211–1216.
- Rolán, E., Vilas, F. & Nombela, M.A., 1987. Fauna malacológica de los estuarios-lagoones y sus variaciones por cambios de salinidad. *Iberus*, 7(1), pp.59–65.
- Rollinson, D. et al., 1997. Observations on compatibility between *Bulinus truncatus* and *Schistosoma haematobium* in the Senegal River Basin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91(4), pp.371–378. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-8544276548&partnerID=tZ0tx3y1>.
- Rollinson, D. et al., 1990. Observations on natural and experimental interactions between *Schistosoma bovis* and *S. curassoni* from West Africa. *Acta Tropica*, 47(2), pp.101–114.
- Rollinson, D. et al., 1997. Some molecular insights into schistosome evolution. *International Journal for Parasitology*, 27(1), pp.11–28.
- Rollinson, D. et al., 2013. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Tropica*, 128(2), pp.423–440. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.013>.
- SADUN, E.H., 1962. Intradermal and fluorescent antibody tests on humans exposed to *Schistosoma bovis cercariae* from Sardinia. *Bulletin of the World Health Organization*, 27, pp.810–814.
- Sánchez-Guillén, R.A. et al., 2014. Hybridization rate and climate change: Are endangered

- species at risk? *Journal of Insect Conservation*, 18(3), pp.295–305.
- Schilthuizen, M., Giesbers, M.C.W.G. & Beukeboom, L.W., 2011. Haldane's rule in the 21st century. *Heredity*, 107(2), pp.95–102.
- Schlagenhauf, P. et al., 2015. Travel-associated infection presenting in Europe (2008-12): an analysis of EuroTravNet longitudinal, surveillance data, and evaluation of the effect of the pre-travel consultation. *The Lancet. Infectious diseases*, 15(1), pp.55–64.
- Schwenk, K., Brede, N. & Streit, B., 2008. Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1505), pp.2805–2811. Available at: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/363/1505/2805>.
- Seehausen, O., 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(4), pp.198–207.
- Shapira, R. et al., 2014. Extensive heterosis in growth of yeast hybrids is explained by a combination of genetic models. *Heredity*, 113(4), pp.316–326. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2014.33>.
- Silva, M.L. et al., 1977. Susceptibility of *Planorbarius metidjensis* from Portugal and Spain to *Schistosoma bovis* from Salamanca, Spain. *Malacologia*, 16(1), pp.251–254.
- Silva, O.L., Simoes, M. & Fraga, de A.J., 1974. Comparative study of the behaviour between the *Planorbarius metidjensis* and the *Bulinus contortus* towards infection by *Schistosoma haematobium*. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 2(1–4), p.541.
- Simoes, M. & Medeiros, L. de, 1980. Susceptibility of *Planorbarius metidjensis* and *Bulinus contortus* of Portugal to *Schistosoma haematobium* of Angola. *Garcia de Orta, Zoologia*, 9(1/2), pp.67–70.
- Song, G. et al., 2013. Global RNA sequencing reveals that genotype-dependent allele-specific expression contributes to differential expression in rice F1 hybrids. *BMC Plant Biology*, 13(1), p.221. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/221>.
- Southgate, V.R. et al., 1983. Is *Planorbarius metidjensis* compatible with *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*? *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*, 77(4), pp.409–506.
- Southgate, V.R., Wijk, H.B. & Wright, C.A., 1976. Schistosomiasis at Loum, Cameroun; *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their natural hybrid. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 49(2), pp.145–159. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00382422>.
- Steinauer, M.L. et al., 2008. Introgressive hybridization of human and rodent schistosome parasites in western Kenya. *Molecular Ecology*, 17(23), pp.5062–5074.
- Steinauer, M.L., Blouin, M.S. & Criscione, C.D., 2010. Applying evolutionary genetics to schistosome epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(4), pp.433–443.

Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.02.007>.

- Stothard, J.R. et al., 2013. Schistosomiasis in African infants and preschool children: let them now be treated! *Trends in parasitology*, 29(4), pp.197–205.
- Sturrock, R.F., 2001. Schistosomiasis Epidemiology and Control: How Did We Get Here and Where Should We Go? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(SUPPL.), pp.17–27.
- Swanson-Wagner, R.A. et al., 2006. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(18), pp.6805–6810. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510430103>.
- Tan, S.Y. & Ahana, A., 2007. Theodor Bilharz (1825 - 1862): discovery of schistosomiasis. *Singapore Medical Journal*, 48(3), pp.184–185.
- Taylor, M., 1970. Hybridization experiments on 5 species of African schistosomes. *Journal of Helminthology*, 44(3–4), pp.253–314. Available at: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=5&SID=X11Fdjll557la8on@8c&page=1&doc=1%5Cnhttp://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=Refine&qid=4&SID=Y1Co3gh1LMdl47Ja1o4&page=1&doc=1.
- Tchuem Tchuente, L.A., Southgate, V.R., Jourdan, J., et al., 1997. Hybridisation between the digeneans *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei*: Viability of hybrids and their development in sheep. *Systematic Parasitology*, 36(2), pp.123–131.
- Tchuem Tchuente, L.A. et al., 1994. Interspecific Stimulation of Parthenogenesis in *Schistosoma*-*Intercalatum* and *Schistosoma*-*Mansoni*. *Journal of Helminthology*, 68(2), pp.167–173.
- Tchuem Tchuente, L.A. et al., 1996. Mating behaviour in schistosomes: Are paired worms always faithful? *Parasitology Today*, 12(6), pp.231–236.
- Tchuem Tchuente, L.A., Southgate, V.R., Njiokou, F., et al., 1997. The evolution of schistosomiasis at Loum, Cameroon: Replacement of *Schistosoma intercalatum* by *S. haematobium* through introgressive hybridization. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(6), pp.664–665.
- Tebeje, B.M. et al., 2016. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites and Vectors*, 9(1), pp.1–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1799-4>.
- Théron, a, Pages, J.R. & Rognon, a, 1997. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. *Experimental parasitology*, 85, pp.1–9.
- Théron, A., 2015. *Chronobiology of trematode cercarial emergence: From data recovery to epidemiological, ecological and evolutionary implications*, Elsevier Ltd. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apar.2015.02.003>.
- Touassem, R. & Jourdan, J., 1986. Étude de la compatibilité de *Schistosoma bovis* du

- Soudan et d'Espagne vis-à-vis de *Bulinus truncatus* de Tunisie et *Planorbarius metidjensis* du Maroc. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 61(1), pp.43–54. Available at: <http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/198661143>.
- Tsai, H. et al., 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloa* species. , 91(March), pp.2542–2546.
- Turissini, D.A. & Matute, D.R., 2017. Fine scale mapping of genomic introgressions within the *Drosophila yakuba* clade. *PLOS Genetics*, 13(9), p.e1006971. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1006971>.
- Turner, T.L., Hahn, M.W. & Nuzhdin, S. V., 2005. Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, 3(9), pp.1572–1578.
- Ungerer, M.C., Strakosh, S.C. & Zhen, Y., 2006. Genome expansion in three hybrid sunflower species is associated with retrotransposon proliferation. *Current Biology*, 16(20), pp.872–873.
- Viana, A. et al., 1998. Murine *Schistosoma bovis* infection : analysis of parasitic and immune parameters. , (August 1997), pp.143–153.
- Villasante Ferrer, A. et al., 2018. [Study of the current status of *Schistosoma haematobium* infection in the European Union. An approach to the possible risk in Spain]. *Revista espanola de salud publica*, 92. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/29637924>.
- Webster, B.L. et al., 2006. A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. *International Journal for Parasitology*, 36(8), pp.947–955.
- Webster, B.L. et al., 2013. Introgressive Hybridization of *Schistosoma haematobium* Group Species in Senegal: Species Barrier Break Down between Ruminant and Human Schistosomes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4).
- Webster, B.L., 2003. On the interactions of *Schistosoma haematobium*, *S. guineensis* and their hybrids in the laboratory and in the field. *London: University College London*.
- Webster, B.L. et al., 2005. The interaction of *Schistosoma haematobium* and *S. guineensis* in Cameroon. *Journal of Helminthology*, 79(3), pp.193–197. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-23944443240&partnerID=tZOtx3y1>.
- Webster, B.L. & Southgate, V.R., 2003. Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology*, 127(3), pp.231–242. Available at: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=Refine&qid=14&SID=Y1Co3gh1LMdl47Ja1o4&page=1&doc=4.
- Webster, B.L. & Southgate, V.R., 2003. Mating interactions of *Schistosoma haematobium* and *S. intercalatum* with their hybrid offspring. *Parasitology*, 126(4), pp.327–338.

- Webster, J.P. et al., 2016. One health - an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evolutionary Applications*, 9(2), pp.313–333. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/eva.12341>.
- Welter-Schultes, F.W., 2012. *European non-marine molluscs, a guide for species identification.*—Planet Poster Editions, Göttingen, pp. A1-A3, 1-679, Q1-Q78, ISBN 978-3-933922-75-5.
- WHO, 2017. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2016. *Weekly Epidemiological Record*, 92(49), pp.749–60. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259593/WER9249.pdf;jsessionid=CD72D39B595B295BA9A4CFD81146AC12?sequence=1%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219964%5Cnhttp://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=KARDEX.xis&method=post&formato>.
- Wilson, R.A. & Coulson, P.S., 2006. Schistosome vaccines: A critical appraisal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(SUPPL. 1), pp.13–20.
- Wright, A.E., Moghadam, H.K. & Mank, J.E., 2012. Trade-off between selection for dosage compensation and masculinization on the avian Z chromosome. *Genetics*, 192(4), pp.1433–1445.
- Wright, C.A. et al., 1974. Hybrids between *Schistosoma haematobium* and *S. intercalatum* in Cameroon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(5), pp.413–414.
- Wright, C.A. & Ross, G.C., 1980. Hybrids between *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei* and their identification by isoelectric focusing of enzymes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(3), pp.326–332.
- Wu, X. et al., 2016. Comparative transcriptome analysis among parental inbred and crosses reveals the role of dominance gene expression in heterosis in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, 6(October 2015), pp.1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21124>.
- Xavier, M., 1965. Susceptibility of *Planorbarius metidjensis* (Forbes) from the south of Portugal (Algarve) and *Bulinus* (Ph.) *africanus* from Portuguese Guinea to *Schistosoma haematobium* from the same overseas province. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 22(1/4).
- Yacoubi, B. et al., 2007. Habitats of *Bulinus truncatus* and *Planorbarius metidjensis*, the intermediate hosts of urinary schistosomiasis, under a semiarid or an arid climate. *Parasitology Research*, 101(2), pp.311–316.
- Yacoubi, B. et al., 1999. *Schistosoma haematobium*: comparative studies on the characteristics of infection in three populations of *Planorbarius metidjensis* from the Agadir province in South Morocco. *Parasitology research*, 85(3), pp.239–242.
- Zekhnini, A. et al., 2002. Effect of a short period of desiccation during the patent period on cercarial shedding of *Schistosoma haematobium* from *Planorbarius metidjensis*. *Parasitology research*, 88(8), pp.768–771.

Zekhnini, A. et al., 1997. Schistosoma haematobium: comparative studies on prevalence and cercarial shedding according to the shell diameter of Planorbarius metidjensis at miracidial exposure. *Parasitology research*, 83(3), pp.303–305.