



# Développement d'outils d'écologie moléculaire pour un suivi intégratif des maladies transmises par les mollusques d'eau douce dans un contexte d'émergences et de changements globaux

Stephen Mulero

## ► To cite this version:

Stephen Mulero. Développement d'outils d'écologie moléculaire pour un suivi intégratif des maladies transmises par les mollusques d'eau douce dans un contexte d'émergences et de changements globaux. Biodiversité et Ecologie. Université de Perpignan, 2020. Français. NNT : 2020PERP0023 . tel-03117259

**HAL Id: tel-03117259**

**<https://theses.hal.science/tel-03117259>**

Submitted on 21 Jan 2021

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par  
**UNIVERSITÉ DE PERPIGNAN VIA DOMITIA**

Préparée au sein de l'école doctorale  
**Énergie Environnement (ED305)**

Et de l'unité de recherche  
**UMR 5244 - Interaction Hôtes-Pathogènes-  
Environnements (IHPE)**

Spécialité : **Biologie**

Présentée par  
**Stephen Mulero**

**Développement d'outils d'écologie moléculaire  
pour un suivi intégratif des maladies transmises par  
les mollusques d'eau douce dans un contexte  
d'écurrences et de changements globaux**

Soutenue le 13 novembre 2020 devant le jury composé de

M. **Johan MICHAUX**, DR, Université de Liège GeCoLAB  
M. **Patrice DAVID**, DR1 CNRS, UMR 5175 CEFE  
Mme. **Aurélié BONIN**, Dr, Université de Milan DESP  
M. **Jean-Nicolas BEISEL**, PR, Université de Strasbourg ENGEE  
M. **Olivier VERNEAU**, PR, UMR 5110 CEFREM  
M. **Jean-Pierre POINTIER**, MCF, USR 3278 CRIOBE  
Mme. **Sylvie HURTREZ-BOUSSÈS**, PR, IRD 224 MiVEGEC

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Président  
Invité  
Invitée

M. **Jérôme BOISSIER**, PR, UPVD UMR 5244 IHPE  
M. **Olivier REY**, MCF, UPVD UMR 5244 IHPE

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse



*À Michel Dast,*





Pendant ces trois années de thèse, j'ai été impliqué dans la production de plusieurs articles scientifiques dont certains ont été publiés ou sont en cours d'écriture ou de publication. Bien que l'ensemble de ces études s'inscrivent dans le contexte plus large qu'est l'étude des maladies transmises par les mollusques d'eau douce par des approches intégratives (*e.g.* diagnostics intramolluscal, génétique des populations et stratégie de reproduction), plusieurs de ces publications ne figureront pas entièrement dans le présent manuscrit pour des raisons de cohérence.

### Liste des publications parues

- Ruben, S., Carolus, H., Hammoud, C., **Mulero, S.**, Mudavanhu, A. & Huyse, T., (2019). "A Multiplex Rapid Diagnostic PCR (RD-PCR) approach for xenomonitoring of human and animal schistosomiasis in a One Health context." *TRSTMH* 0(8). DOI : 10.1093/trstmh/trz067
- Vazquez, A., Sabourin, E., Pilar, A., Leroy, C., Leray, C., Carron, E., **Mulero, S.**, Caty, C., Hasfia, S., Boisseau, M., Saugné, L., Pinaeu, O., Blanchon, T., Alba, A., Vittecoq, M. & Hurtrez-Boussès, S., (2020). "Genetic diversity and relationships of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda) with native and introduced definitive and intermediate hosts." *TBED* 0(13). DOI : 10.1111/tbed.13882

### Liste des publications en révision par les pairs ou en préparation

- Hammoud, C., **Mulero, S.**, Van Bocxlaer, B., Boissier, J., Verschuren, D., Albrecht, C. & Huyse, T., (in prep). "Simultaneous genotyping of gastropods and their trematode parasites using Amplicon Sequencing."
- Kincaid-Smith, J., Mathieu-Bégné, E., Chaparro, C., Reguera-Gomez, M., **Mulero, S.**, Allienne, J-F., Toulza, E. & Boissier, J., (in prep). "Pre-zygotic isolation mechanisms between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis* parasites: from mating interactions to differential gene expression."



## Remerciements

---

Alors que j'écris ces quelques lignes, j'entrevois enfin l'aboutissement de cette aventure de trois ans. Des années pendant lesquelles j'ai beaucoup évolué au fil des différentes épreuves que j'ai eu l'occasion de vivre et de surmonter, qu'elles soient bonnes ou mauvaises. Beaucoup pensent que la thèse est une aventure plutôt solitaire, mais tout comme un laboratoire et son écosystème, ce n'est pas totalement vrai. Voici donc quelques remerciements pour les personnes sans lesquelles cette histoire n'aurait pas été possible.

Je tiens à commencer par remercier les membres du jury, **Johan Michaux** et **Patrice David**, les deux rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que **Aurélie Bonin**, **Jean-Nicolas Beisel** et **Olivier Verneau**, les examinateurs. Merci de vous être déplacés et d'avoir pris le temps de lire et d'évaluer mes écrits.

**Sylvie**, merci de m'avoir accompagné dans le monde de la recherche pendant toutes ces années, en commençant par les cours de génétique des populations à la fac de Montpellier, puis par le stage de master 2 avec **Marion** et **Emeline**, pendant lequel j'ai appris énormément. Merci d'avoir fait partie de mon comité de thèse et maintenant de mon jury de thèse, merci pour tes encouragements tout au long de ces années et les innombrables conseils que tu m'as apportés, j'espère que nous aurons l'occasion de travailler à nouveau sur les mêmes projets.

**Jean-Pierre**, merci de nous faire partager ta passion pour la malaco et ton expertise de terrain sur le sujet à chacune de nos sorties. Merci aussi pour toutes ces conversations passionnantes et pour ta participation à mon jury de thèse. Ça a été un grand plaisir de découvrir le monde de la malaco, j'espère avoir l'occasion de retourner chasser du mollusque en ta compagnie.

Un immense merci à **Jérôme** et **Olivier**, mes directeurs de thèse sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. **Jérôme**, merci de m'avoir accompagné pendant toutes ces années, des cours d'éthologie avec les guppys et des biostatistiques où j'étais nullissime jusqu'en stage de master 1 pendant lequel avec Eve vous m'avez donné goût à la recherche. Merci également de m'avoir fait confiance durant toutes ces années, avec les deux premiers suivis environnementaux en Corse puis avec ce super projet de thèse. Merci pour tes innombrables conseils et pour tout ce que tu m'as appris, mais aussi pour toutes ces conversations sérieuses ou drôles pendant toutes ces années. **Olivier**, je ne compte plus le nombre de fois où je suis venu frapper à la porte de à ton bureau. Merci d'avoir toujours répondu présent, pour ta bonne humeur, pour tes conseils avisés, sans toi l'anglais et la qualité scientifique de toutes

les publiées ne seraient probablement pas celles d'aujourd'hui. Merci aussi de m'avoir motivé pour ne rien lâcher toutes ces années, et pour tes encouragements à participer à des formations et à faire de l'enseignement.

J'ai vraiment eu de la chance de vous avoir comme directeurs de thèse, votre encadrement est très complémentaire. Merci pour votre confiance et pour l'autonomie que vous m'avez laissée pendant ces trois années, ce qui m'a permis de m'améliorer sur beaucoup d'aspects. J'espère avoir été à la hauteur et avoir l'occasion de retravailler avec vous à l'avenir.

Je tiens ensuite à remercier les autres membres de mon comité de thèse. **Eve**, merci pour ta confiance, pour m'avoir accompagné et encouragé depuis la Licence. Tu m'as appris la majorité de ce que je sais de la bio-informatique, ça ne s'oublie pas ! Merci pour toutes ces conversations enrichissantes, notamment pendant les CSI où tu as toujours su trouver le détail qui permettait d'améliorer la qualité de mes travaux. **Tine**, merci pour tes conseils et tes encouragements pendant ces trois années. Merci aussi de m'avoir impliqué dans les travaux de **Cyril** et de **Ruben**, que je remercie au passage.

Merci aux collègues de projets extérieurs au labo, notamment **Philippe Jarne**, **Kevin Bethunes** et encore une fois **Patrice David**. Merci de m'avoir impliqué dans le projet de metabarcoding environnemental de la malacofaune de Guadeloupe, j'ai hâte de retourner à l'analyse de ces données après le rendu de ce manuscrit de thèse. Merci également à **Yann Quilichini** et **Joséphine Foata** de m'avoir accompagné lors de toutes les missions de terrain en Corse, vous vivez dans un bien bel endroit.

Je remercie également **Guillaume Mitta** et **Christoph Grunau**, les deux DU de l'IHPE. Merci pour votre accueil au sein de l'unité, pour vos conseils et pour vos enseignements. À votre contact j'ai beaucoup appris sur le fonctionnement d'un laboratoire grâce à l'HCERES, aux réunions et aux conseils d'unité.

**Jean-François**, tu m'as appris tout ce que je sais de la biologie moléculaire ! Merci pour le temps que tu as passé à me former à toutes ces manipulations. Et merci d'avoir toujours été là en cas de doute sur la paillasse et pour toutes ces conversations enrichissantes et motivantes. Je n'ai jamais vu quelqu'un d'aussi doué en biomol ! **Richard**, merci pour ta bonne humeur permanente et pour toutes ces conversations plaisantes et enrichissantes au quotidien. C'est grâce à vous deux que manipuler en salle biomol fut un plaisir !

**Benjamin**, merci pour toutes ces conversations enrichissantes et plaisantes et pour ton soutien. Tes connaissances sur le cycle du schisto sont impressionnantes, merci de les avoir partagés. Merci aussi pour ton rôle de médiateur dans la gestion de situations qu'on a eu au bureau des docs pendant ces trois années, tu es un chef de site au top.

**David**, merci pour toutes ces conversations intéressantes, souvent à des heures avancées de la journée. Tu as toujours le bon conseil pour nous permettre de mener la thèse à bien. Merci aussi d'être présent aux événements organisés par les doctorants de l'Université, ça fait plaisir de voir que les chercheurs nous soutiennent !

**Anne M., Diane, Sylvie** et maintenant **Camille**, ou devrai-je dire les super nanas ! Merci d'être là, sans vous c'est certain que l'organisation du moindre événement deviendrait BEAUCOUP plus compliqué. Merci aussi pour votre bonne humeur constante, votre disponibilité et pour votre soutien dans tous les événements organisés par les doctorants ! On est toujours content de voir des gens du labo y assister et communiquer dessus.

**Juliette**, merci de m'avoir impliqué dans ton projet dans les P.O., de m'avoir fait confiance pour réaliser des tests moléculaires pour identifier du parasite de terrain. Merci pour tes conseils, mais aussi pour tes enseignements quand j'étais encore en licence de bio.

Une pensée pour **Nathalie, Anne R. et Cindy**, sans qui les animaleries du labo ne fonctionneraient pas aussi bien. Merci pour ces conversations intéressantes et plaisantes. **Cindouche**, merci pour tes pauses « décompression » au bureau, c'était toujours rafraichissant de pouvoir parler d'autre chose que du boulot.

**Julien P., Luc, Rémi et Damien**, merci pour toutes ces conversations politiquement correctes aux pauses de midi et café, c'est très rafraichissant. J'ai rarement autant rigolé que pendant ces conversations complotistes et pendant lesquelles nous refaisons le monde et l'actualité. Restez comme vous êtes !

**Boris**, merci pour toutes ces conversations intéressantes et pour ton soutien lorsque nous partageons nos péripéties de thèse. Et bon courage pour la suite, malgré le nombre d'imprévus que tu as rencontré, tu as géré ta thèse comme un chef !

Merci aussi à tous les anciens doctorants que j'ai eu l'occasion de connaître, notamment **Julien K-S.**, merci de m'avoir impliqué dans tes travaux, j'ai beaucoup appris ! **Aude** et **Kelly**, pour vos sourires et votre bonne humeur permanente. **Camille H.** et **Manouche**, le binôme qui rendais le bureau plus vivant ! **Camille H.**, ça m'a manqué de partager nos déboires de thèse, je te souhaite bon courage pour la suite et bonne continuation, PS. Manon te cherche. **Manon**, merci d'avoir toujours répondu à mes questions pour l'organisation de la soutenance et du dépôt de manuscrit. Comme Camille, ça m'a manqué de partager nos peines de thésards, faut se refaire une session Witcher III ! Et je te souhaite bon courage pour la suite ! C'est la classe que tu aies trouvé un postdoc aussi vite, ça prouve que tu es bien à ta place dans la recherche. J'espère que tu as fini par retrouver Millou.

Je tiens également à remercier les stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer ou de co-encadrer, notamment **Anaïs L.**, qui à commencer à développer avec moi l'outil d'ADNe ciblé pour *B. truncatus*, tu as pu faire un super stage malgré toutes les difficultés techniques rencontrées dans cette phase de développements. **Anaïs B.**, que j'ai encadrée indirectement pendant son stage et pendant les suivis environnementaux en Corse. Bon courage pour la suite, c'est très bien parti. Et **Philippe**, sans qui la partie sur le metabarcoding de trématodes ne serait pas autant avancée, bon courage pour ta thèse. Tu vas pouvoir continuer cette longue histoire sur l'ADN environnemental avec quelques verrous techniques en moins. Je crois que vous avez tous réalisé un été de suivi environnemental sur les bullins du Cavu, un drôle d'héritage en commun.

Avant de passer aux amis et à la famille, j'aimerais remercier tous les autres membres du labo que j'aurais pu oublier. Notamment les **Montpelliérains**, pour tous ces moments de convivialités lors des divers évènements inter-équipes. Mais aussi **Hélène**, pour ces quelques conversations que nous avons eues sur la musique classique. **Gabriel**, toujours souriant dans les couloirs. **Cristian**, pour toutes ces conversations et histoires intéressantes pendant les pauses de midi. Merci à l'ensemble des personnes présentes à l'IHPE de maintenir cet écosystème si caractéristique et attachant de l'IHPE.

Maintenant, passons à la mention spéciale à destination de tous les rôlistes. Je pense pouvoir dire sans peine que vous avez redéfini ma notion de l'amitié, et heureusement que je vous ai rencontrés, c'est probablement l'une des meilleures choses qui me soient arrivées pendant ces trois ans de thèse et une page ne suffit pas à tout raconter.

**Éléonore**, merci d'avoir été là pour me soutenir dans les moments les plus difficiles de la thèse. Je suis toujours impressionné par ta capacité de travail (qui doit se compter en plusieurs doctorants), ne lâche rien je suis sûr que tu parviendras à rendre une thèse extraordinaire et dans les temps. Merci pour toutes ces conversations encourageantes et rafraichissantes. Et

merci de nous faire découvrir ton univers par tes sessions de maîtrise toujours aussi prenantes et dont le scénario est digne d'un grand film d'enquêtes policières. Tu es l'une des plus belles rencontres de cette semaine d'intégration.

**Mélody**, #Yamélo ! Merci pour toutes ces conversations rigolotes et pour ton humour rafraichissant, pas mal de fois tu m'as remonté le moral. Merci aussi de m'avoir accompagné pendant toutes ces aventures papier (je crois qu'on est sur toutes les campagnes de JDR), c'est dingue les rencontres qu'on peut faire en semaine d'intégration de l'ED, ça change la vie.

**Mégane**, vive les fe..., et les loutres ... et les licornes ! Merci d'avoir été là pendant ces trois années, et pour tous ces moments détente autour d'une bière ou de dés. J'espère que nous ne nous perdrons pas de vue, surtout le jour où tu auras acheté ta Harley Iron modèle non réduite, on veut voir l'unboxing !

**Mélina**, eh oui le pouvoir du pole dance ne te fera pas esquiver ces remerciements non plus, merci pour tous ces bons moments passés ensembles et pour toutes ces conversations rigolotes. Tu nous manques depuis que tu es à Gérone, mais on arrive à se voir assez souvent, faut que ça continue !

Vive la team Scotland ! À refaire 😊

**Alicia**, je crois que j'ai regardé tes let's play pendant toute ma rédaction (cf. le like en bas de chaque vidéo). Merci pour tous ces moments de détente, le JDR n'a jamais été aussi drôle que depuis que tu as rejoint nos tables. Comme pour tous les autres, il ne faut pas qu'on se perde de vue ! De toute façon je t'emmerderais pour écrire un projet de post doc après la thèse (ça me motivera aussi).

**Chrystelle**, l'une des nouvelles du groupe ! Ça a été cool de te rencontrer à l'IHPE. Merci pour tous ces moments de détente, et j'espère que nous aurons encore longtemps l'occasion de parler de mangas et d'animés. Je me sentais moins seul en tant qu'otaku grâce à toi. 😊

**Méryl**, la petite nouvelle, ça a été un plaisir de te rencontrer en dehors du cadre du travail. Merci pour la mission de terrain que tu as brillamment menée en Corse avec Anaïs. Mais surtout merci pour ta gentillesse, et pour tous ces bons moments passés ensemble en JDR. Bon courage pour la thèse !



Et maintenant notre duo gagnant, **Nélia et Sylvain**. **Nélia**, en plus d'être une super doctorante et collègue de travail, tu es une super amie. Ça a été un plaisir de partager des moments rigolos et nos peines de thésards pendant ces trois années, j'ai toujours adoré tes anecdotes sur ta vie et la sagesse qui s'en dégage (on dirait que tu en a vécu plusieurs !). J'espère que nous aurons l'occasion de continuer à nous voir. PS Si tu cherches ton portable et ta gourde, ils sont dans les toilettes du labo, sur la trousse de pharma. **Sylvain**, notre investisseur préféré. Ça a été un plaisir de te rencontrer, merci pour toutes ces conversations rigolotes et ces sessions de JDR (même si on a cassé le monde). De toute façon, une fois ce manuscrit rendu, je ressors de ma grotte pour venir vous voir.

**Benjamin**, comme pour Sylvain, merci pour ces moments de détente autour de dés et/ou de pizzas. On se revoit bientôt !

Et maintenant passons aux « meujeus » portés disparus. **Christophe**, merci pour tous ces moments de détente et pour nous avoir fait découvrir le monde du JDR. C'est dommage que nous nous soyons perdus de vue, bon courage pour tes nouvelles carrières, surtout celle de papa. **Charlotte**, comme pour Christophe, bon courage pour cette aventure qu'est la maternité, ça a été un plaisir de te rencontrer et de découvrir ton univers de rôlistes. J'espère que nous nous reverrons. **J.B.** et **Antho**, un vrai plaisir de vous avoir rencontré grâce à Elé, je n'ai rarement autant rigolé qu'avec vous et vos univers rôlistiques qui nous manquent beaucoup ici à Perpignan. J'espère que nous aurons l'occasion de nous revoir prochainement, et bon courage pour tout ce que vous entreprendrez !

Et pour finir je tiens à remercier **mes parents**, merci pour votre soutien indéfectible de mon premier souffle à aujourd'hui, vous m'avez permis de devenir la personne que je suis. Vous m'avez supporté et soutenu toutes ces années, même quand c'était très difficile. Merci pour votre amour infini, c'est un véritable honneur et privilège de vous avoir pour parents, je vous aime infiniment. Merci Maman d'avoir pris le temps de relire mes écrits. Et merci à mes trois sœurs, **Cyrielle, Lauriane et Julie**, mes trois petits rayons de lune (comprendront ceux qui comprendront), qui sont une source d'inspiration et de motivation constante pour moi, je suis très fier d'être votre frère et de ce que vous êtes devenues, des superhéroïnes des hôpitaux pour Cycy et Loulou, et pour Julie celle qui nous permettra de repousser les limites du monde connu, n'abandonne pas ton rêve de devenir astrophysicienne. Je vous aime.

**« Le principal fléau de l'humanité n'est pas l'ignorance, mais le refus de savoir »**

Simone de Beauvoir, 1908-1986

## Table des matières

---

|                                                                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction générale .....</b>                                                                                                                                            | <b>1</b>  |
| <b>1. L'effet des changements globaux sur les écosystèmes mondiaux à l'heure de l'Anthropocène.....</b>                                                                       | <b>1</b>  |
| a. L'Homme et l'environnement .....                                                                                                                                           | 1         |
| b. Les changements globaux .....                                                                                                                                              | 3         |
| L'origine des changements globaux .....                                                                                                                                       | 4         |
| Les écosystèmes d'eau douce, un exemple des conséquences des changements globaux sur les écosystèmes .....                                                                    | 11        |
| <b>2. Les changements globaux et la parasitologie .....</b>                                                                                                                   | <b>14</b> |
| a. Un risque infectieux grandissant .....                                                                                                                                     | 14        |
| b. Le cas des interactions mollusques/parasites .....                                                                                                                         | 18        |
| <b>3. Du tropical vers le tempéré, le cas de la bilharziose .....</b>                                                                                                         | <b>22</b> |
| a. Les bilharzioses.....                                                                                                                                                      | 22        |
| b. Épidémiologie.....                                                                                                                                                         | 24        |
| c. Des émergences de bilharzioses dans le monde.....                                                                                                                          | 25        |
| Une émergence en cours : La bilharziose en Corse.....                                                                                                                         | 27        |
| <b>4. Les outils existants pour le suivi des maladies transmises par les mollusques d'eau douce .....</b>                                                                     | <b>29</b> |
| a. Le diagnostic médical .....                                                                                                                                                | 29        |
| b. Le diagnostic environnemental .....                                                                                                                                        | 31        |
| c. L'ADN environnemental .....                                                                                                                                                | 33        |
| Définitions .....                                                                                                                                                             | 33        |
| Historique.....                                                                                                                                                               | 34        |
| Les différentes approches basées sur l'ADNe.....                                                                                                                              | 36        |
| <b>5. Objectifs et problématique de la thèse .....</b>                                                                                                                        | <b>37</b> |
| <b>CHAPITRE I : Facteurs d'émergences de maladies infectieuses, le cas de la bilharziose .....</b>                                                                            | <b>41</b> |
| <b>1. Le processus d'émergences de maladies infectieuses.....</b>                                                                                                             | <b>41</b> |
| a. La préadaptation ou exaptation du schistosome aux milieux tempérés .....                                                                                                   | 46        |
| b. Le rôle des mollusques hôtes intermédiaires dans le processus d'émergence .....                                                                                            | 47        |
| c. Le rôle des hôtes réservoirs domestiques et sauvages dans le processus d'émergence .....                                                                                   | 59        |
| <b>CHAPITRE II : Développement d'outils de diagnostic ciblés pour contrôler l'évolution des maladies transmises par les mollusques d'eau douce dans l'environnement .....</b> | <b>78</b> |

|                                                                                                                                                                                           |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1. Détection de l'hôte mollusque dans son environnement pour l'identification de sites à risque d'émergence .....</b>                                                                  | <b>80</b>  |
| a. Détection ciblée de <i>Bulinus truncatus</i> par ADN environnemental .....                                                                                                             | 82         |
| Développement de l'outil de diagnostic en mésocosme .....                                                                                                                                 | 84         |
| Application de l'outil de diagnostic en milieu naturel.....                                                                                                                               | 87         |
| <b>2. Détection intramolluscale de trématodes pour l'identification des sites de transmission actifs et potentiels .....</b>                                                              | <b>105</b> |
| a. Détection intramolluscale ciblée de <i>Schistosoma haematobium</i> , le diagnostic Dral-PCR .....                                                                                      | 107        |
| b. Développement d'outils de diagnostic PCR rapide pour la détection intramolluscale simultanée de plusieurs espèces de trématodes .....                                                  | 114        |
| <b>CHAPITRE III : Développement d'outils de metabarcoding environnemental pour la caractérisation et l'étude des communautés de mollusques et de trématodes en milieux naturels .....</b> | <b>119</b> |
| <b>1. Caractérisation des communautés de mollusques d'eau douce par metabarcoding environnemental .....</b>                                                                               | <b>123</b> |
| <b>2. Caractérisation des communautés de trématodes en milieux d'eau douce par metabarcoding environnemental.....</b>                                                                     | <b>161</b> |
| a. Recherche d'un marqueur spécifique à la classe des trématodes .....                                                                                                                    | 164        |
| b. Développements futurs.....                                                                                                                                                             | 171        |
| <b>Perspectives en termes de stratégies de lutte.....</b>                                                                                                                                 | <b>172</b> |
| Remise en contexte .....                                                                                                                                                                  | 172        |
| L'ADN environnemental pour le suivi des maladies transmises par les mollusques d'eau douce et de la biodiversité.....                                                                     | 174        |
| Au-delà du suivi environnemental, la prédiction.....                                                                                                                                      | 179        |
| Perspectives et recommandations pour les stratégies de contrôle de maladies infectieuses transmises par les mollusques d'eau douce .....                                                  | 181        |
| <b>Bibliographie .....</b>                                                                                                                                                                | <b>186</b> |
| <b>Annexes .....</b>                                                                                                                                                                      | <b>218</b> |
| <b>Résumé : .....</b>                                                                                                                                                                     | <b>223</b> |

## Table des illustrations

---

|                                                                                                                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figure 1.</b> Schéma explicatif vulgarisant le processus de fixation des digues menée au début du XIX <sup>e</sup> siècle en Aquitaine par les Ponts et Chaussées. ....                                            | <b>2</b>  |
| <b>Figure 2.</b> Représentation schématique des différents types de changements globaux. ....                                                                                                                         | <b>5</b>  |
| <b>Figure 3.</b> Cumul de l'émission de dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ) émis par chaque pays par l'utilisation d'énergie fossile entre 1751 et 2018. ....                                                       | <b>6</b>  |
| <b>Figure 4.</b> Un exemple d'évènement climatique extrême présenté par Camill, 2010. Des dommages matériels liés à l'inondation de Nashville, USA en mai 2010 à la suite d'un épisode de fortes précipitations ..... | <b>7</b>  |
| <b>Figure 5.</b> Exemple de déforestation en milieu tropical dans l'état de Rondônia dans l'ouest du Brésil entre 2000 et 2012. ....                                                                                  | <b>10</b> |
| <b>Figure 6.</b> Schématisation du réseau d'interactions entre les différents facteurs à l'origine des changements globaux favorisant les émergences de maladies infectieuses dans le monde..                         | <b>15</b> |
| <b>Figure 7.</b> Schématisation des cinq groupes de maladies transmises par les mollusques. ....                                                                                                                      | <b>20</b> |
| <b>Figure 8.</b> Cycle de vie dixène de <i>Schistosoma haematobium</i> . ....                                                                                                                                         | <b>23</b> |
| <b>Figure 9.</b> Schématisation différenciant les foyers de transmission des sites de transmission potentiels et des sites à risque d'émergence. ....                                                                 | <b>31</b> |
| <b>Figure 10.</b> Nombres de publications sur la détection de macroorganismes par ADN environnemental parues entre 2008 et 2018-20. ....                                                                              | <b>36</b> |
| <b>Figure 11.</b> Émergences de bilharzioses en Europe : Comment les changements globaux peuvent élargir les filtres de rencontre et de compatibilité. ....                                                           | <b>42</b> |
| <b>Figure 12.</b> Schématisation des trois stratégies de diagnostics applicables aux maladies transmises par les mollusques d'eau douce. ....                                                                         | <b>79</b> |
| <b>Figure 13.</b> Schéma synthétique de l'expérience en mésocosme sur la persistance de l'ADN de <i>B. truncatus</i> . ....                                                                                           | <b>85</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure 14.</b> Résultats d'un test en aveugle réalisé sur l'ADN extrait de 30 <i>B. truncatus</i> par amplification Dral (Groupe <i>Haematobium</i> ) - <i>cox1</i> ( <i>B. truncatus</i> ), visualisée sur un gel d'agarose 3% coloré au bromure d'éthidium..... | <b>108</b> |
| <b>Figure 15.</b> Différenciation de <i>S. haematobium</i> x <i>bovis</i> et de <i>S. bovis</i> par PCR Sh73-Dral .....                                                                                                                                              | <b>109</b> |
| <b>Figure 16.</b> Expériences de cinétiques de co-infections menées pour tester la spécificité des outils de RD-PCR et de séquençage TAS .....                                                                                                                       | <b>116</b> |
| <b>Figure 17.</b> Arbre consensus construit à partir de l'alignement des 226 séquences de 28S provenant de la collection d'ADN de trématodes, généré sur Geneious par clustering UPGMA. ....                                                                         | <b>166</b> |
| <b>Figure 18.</b> Représentation des séquences d'hybridation des amorces de trématodes ou "sequence logo" .....                                                                                                                                                      | <b>167</b> |
| <b>Figure 19.</b> Pourcentage de séquences amplifiées par les couples d'amorces F1/R1 et F1/R2 .....                                                                                                                                                                 | <b>168</b> |
| <b>Figure 20.</b> Comparaison du pourcentage de séquences de trématodes amplifiées par rapport aux autres groupes taxonomiques représentés dans la base de données .....                                                                                             | <b>169</b> |
| <b>Figure 21.</b> Produits PCR générés par les amorces de trématodes F1/R1 et F1/R2 .....                                                                                                                                                                            | <b>170</b> |
| <b>Figure 22.</b> Les étapes critiques dans le développement d'un outil de diagnostic par ADN environnemental.....                                                                                                                                                   | <b>176</b> |

## Table des annexes

---

|                                                                                                                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Annexe 1.</b> Synthèse des protocoles d'échantillonnage d'ADN environnemental à partir de prélèvements d'eau et de sédiments.....                                                    | <b>218</b> |
| <b>Annexe 2.</b> Matrice de données brutes issues des analyses qPCR de l'expérience contact/persistance menée en mésocosme sur l'ADN environnemental de <i>Bulinus truncatus</i> . .... | <b>219</b> |

## Introduction générale

---

### 1. L'effet des changements globaux sur les écosystèmes mondiaux à l'heure de l'Anthropocène

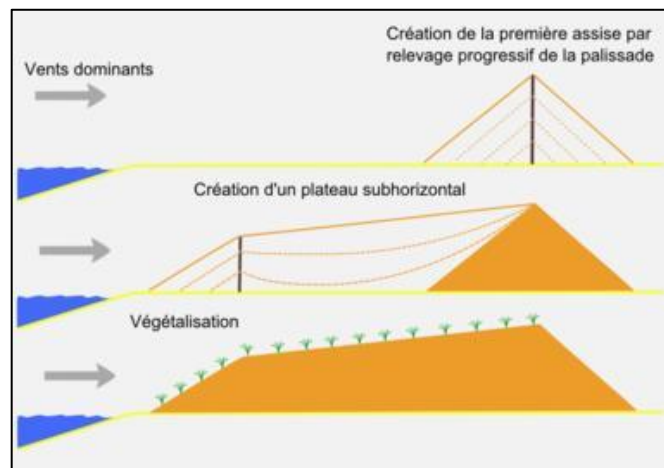
#### a. L'Homme et l'environnement

L'idée d'une interconnexion entre l'activité humaine et l'environnement n'est pas nouvelle. En 1817, le botaniste-zoologiste Jean-Baptiste de Lamarck disait déjà « On dirait que l'homme est destiné à s'exterminer lui-même après avoir rendu le globe inhabitable » (de Lamarck, 1817). C'est en 1864, que ce concept reparaitra dans l'ouvrage *l'Homme et la nature* « *Man and nature* » écrits par l'érudit George Perkins Marsh, dans lequel il explique qu'à l'instar de l'idée prédominante de l'époque « la terre a créé l'Homme » il se pourrait que l'Homme puisse également modifier la Terre par ses activités (Perkins Marsh, 1864), et illustre cette idée par l'effet de la déforestation sur les paysages naturels dans les Alpes françaises, qui ne laisse derrière elle que des zones rocheuses sujettes à une érosion accélérée en raison de la disparition des réseaux racinaires qui maintenaient l'humus en place (Perkins Marsh, 1864). Perkins introduira également quelques notions de conservation en expliquant que laisser des arbres vivant sur place aurait pu permettre à ces environnements de se régénérer avec le temps, et averti la communauté scientifique de l'époque qu'une surconsommation des ressources naturelles par l'Homme pourrait avoir des conséquences irréversibles sur notre espèce (Perkins Marsh, 1864, 2008). En lisant cet ouvrage, le géographe Élisée Reclus confirmera ces conclusions en ajoutant l'exemple de la disparition et de la raréfaction de nombreuses espèces observées depuis l'ère industrielle (Chansigaud, 2013), cependant il nuancera cette vision plutôt pessimiste en présentant quelques exemples bénéfiques de transformation du paysage par l'Homme, notamment la construction de digues naturelles en Aquitaine, **Figure 1** (Chansigaud, 2013).

Quelques années plus tard, la notion d'interconnectivité entre l'Homme et l'environnement se voit renforcée avec l'apparition du concept de la Biosphère (*i.e.* l'ensemble des organismes vivants sur Terre), une notion premièrement proposée par Lamarck en biologie puis formalisée en géologie par le géologue Eduard Suess en 1875

(Rotmans & Vries, 1997; Vernadsky, 2000). Suess propose ce terme afin de différencier le vivant de la lithosphère (*i.e.* couche externe du globe terrestre composée du manteau supérieur et de la croûte terrestre ; Vernadsky, 2000). Ce sera en 1926 que le minéralogiste Vladimir Vernadsky adaptera le concept de biosphère à la biologie et à l'écologie, en expliquant que la vie elle-même est un phénomène géologique capable de changer la surface de la Terre (Vernadsky, 2000). Ce sera à peu près à la même époque, au début du XX<sup>e</sup> siècle avec la troisième révolution industrielle, que le genre humain sera reconnu comme un élément majeur dans les changements qui s'opèrent sur Terre (Rotmans & Vries, 1997).

La pensée sur l'action de l'Homme sur l'environnement va rapidement évoluer pendant la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle, notamment à l'occasion du rapport de l'équipe de Meadows et al. publié en 1972 et intitulé « Limit to Growth » ou « limite à la croissance » (Meadows, Meadows, Randers, & Behrens, 1972). Dans ce rapport dont l'accueil a été très controversé (Buttel, Hawkins, & Power, 1990), l'équipe de Meadows introduit l'idée qu'une croissance incontrôlée des populations humaines et donc de la consommation en ressource naturelle qui en découle pourrait résulter en la disparition de ressources naturelles, en prenant notamment l'exemple des stocks limités de pétrole pour illustrer leurs propos (Meadows et al., 1972). Deux ans plus tard en 1974, Molina et Rowland publieront leur théorie sur la diminution de l'ozone atmosphérique en raison de l'activité humaine, notamment par la production de chlorofluorocarbures (Molina & Rowland, 1974). Cette étude sera une première prise de conscience que l'activité humaine peut avoir un impact non négligeable et grave à l'échelle du globe (Molina & Rowland, 1974; Rotmans & Vries, 1997). Ces publications seront des éléments moteurs dans l'apparition du concept de changement global, et mèneront à une intensification des efforts de recherche dans le domaine avec l'apparition de groupes de travail comme le groupe



**Figure 1. Schéma explicatif vulgarisant le processus de fixation des digues menée au début du XIX<sup>e</sup> siècle en Aquitaine par les Ponts et Chaussées.** Un exemple de transformation du paysage par l'Homme souvent évoqué par Élisée Reclus dans ses travaux en science du paysage. (Source : Larrousiney, WikiCommons)

d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC), dont le premier rapport paraîtra en 1990 (IPCC, 1990), ainsi qu'un nouveau rapport de l'organisation météorologique mondiale (WMO), parut en 1992 et traitant de la diminution de la couche d'ozone à échelle mondiale (WMO, 1992). De même, l'intérêt pour les programmes de recherches internationaux sur le sujet se verra renforcé, notamment pour le comité scientifique des problèmes de l'environnement (SCOPE), ou encore le « International Geosphere-Biosphere Program » (IGBP) crée en 1986 dans ce contexte (Rotmans & Vries, 1997).

### **b. Les changements globaux**

Le terme de changement global ou « global change » apparaît dans la littérature scientifique pendant les années 1970-80 et fait suite à la notion de limite de croissance (Meadows et al., 1972; Buttel et al., 1990). Ce sera dans les années 90 que le concept de changement global évoluera vers celui des changements globaux (Eduscol, 2017), bien que l'expression "changement global" au singulier demeure majoritairement employée, cette pluralité permet d'insister sur l'aspect plurifactoriel des changements globaux qu'ils soient d'origine climatique ou anthropique (Rotmans & Vries, 1997; Eduscol, 2017). Ainsi les changements globaux peuvent se définir par « la totalité des changements imprimés aux écosystèmes qui peuvent être attribués au complexe d'interactions entre l'environnement et l'Homme » (Rotmans & Vries, 1997). L'écosystème étant l'ensemble d'un système constitué d'un complexe d'organismes et d'un complexe de facteurs physico-chimiques caractéristiques de l'environnement accueillant ces organismes, ainsi que l'ensemble des interactions réciproque entre ces deux complexes, selon la définition proposée en 1935 par le botaniste Arthur George Tansley (Tansley, 1935). Dès son apparition, le concept de changement global va rapidement gagner en popularité en devenant un mouvement social à part entière (*e.g.* en regroupant et en labellisant toutes les initiatives de recherche en science de l'environnement ainsi que l'ensemble des politiques de développement durable ; Buttel et al., 1990). A *contrario*, les concepts de limite de croissance et de réchauffement climatique, qui sont encore critiqués de nos jours, demeureront moins populaires principalement en raison de leur incompatibilité avec certains modèles économiques actuels (Buttel et al., 1990). Le concept de réchauffement global mènera même à l'apparition d'un courant de pensée opposé à savoir le climatoscepticisme (Hopkin, 2007).

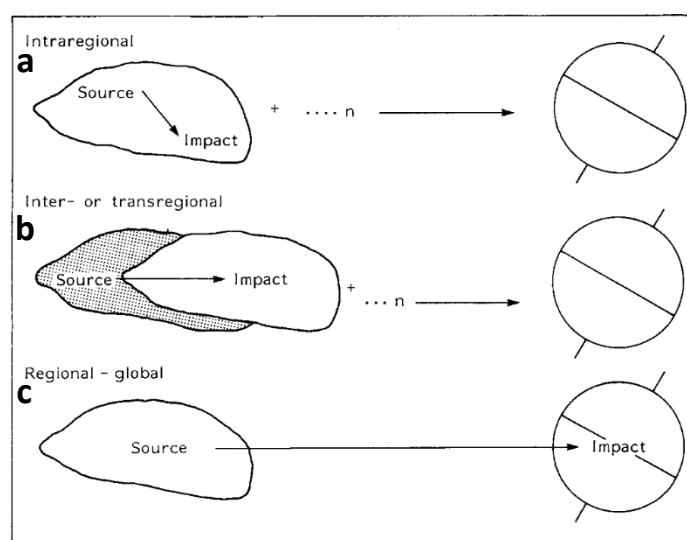


Les changements globaux s'inscrivent dans le cadre conceptuel plus large de l'Anthropocène (Corlett, 2015). Ce terme apparaît pour la première fois dans la littérature scientifique en l'an 2000, dans une publication de Crutzen et Stoermer dans laquelle ils l'emploient pour tenir compte du rôle central de l'Homme en géologie et en écologie (Crutzen & Stoermer, 2000; Corlett, 2015). L'Anthropocène définit l'ère géologique actuelle qui succède à celle de l'Holocène (*i.e.* l'ère interglaciaire s'étendant sur les 10 000 dernières années) elle se définit par l'ère pendant laquelle l'activité humaine s'est suffisamment développée pour être considérée comme une force à l'origine de changements géologiques et environnementaux majeurs au même titre que les processus naturels capables de profondément modifier le système terrestre (Corlett, 2015). Bien que le commencement de cette nouvelle ère géologique ne soit pas clairement délimité (Corlett, 2015), cette distinction avec l'Holocène est apparue nécessaire après le constat que les paramètres environnementaux actuels (*e.g.* concentration en gaz à effet de serre, augmentation de l'acidité des océans et des mers, augmentation du taux d'extinctions d'espèces, augmentations des invasions biologiques, etc.) étaient significativement différents de ceux mesurés lors de l'Holocène (Zeebe, 2012; Hartmann et al., 2013; Simberloff, 2014; Corlett, 2015; De Vos, Joppa, Gittleman, Stephens, & Pimm, 2015). Les changements globaux et leur accélération ces derniers siècles apparaissent donc comme le bouleversement majeur caractérisant l'avènement de l'Anthropocène (Steffen et al., 2004).

### L'origine des changements globaux

Bien que les changements globaux soient par définition des phénomènes de grande ampleur et dont les causes et les conséquences sont multiples, ces derniers peuvent être subdivisés en deux catégories indissociables l'une de l'autre (Turner et al., 1990; Rotmans & Vries, 1997). D'une part, les changements globaux dits systémiques (Turner et al., 1990), **Figure 2c**, dont les effets sont décelables sur la totalité du système (*i.e.* le globe terrestre) comme les changements climatiques et les phénomènes naturels qui leur sont associés (*e.g.* perturbations des températures et des précipitations ; WMO, 1992; Church et al., 2013; IPCC, 2019b). D'autre part, les changements globaux dits cumulatifs (Turner et al., 1990), **Figure 2a,b**, s'observent à des échelles plus localisées (*e.g.* un écosystème en particulier), mais leurs conséquences se répercutent sur l'ensemble du système terrestre (*e.g.* l'acidification des

océans, la diminution de la couche d'ozone, la désertification et la déforestation en raison de la pollution et de l'exploitation des terres par l'Homme ; IPCC, 2019a). Je vais illustrer la différence entre ces deux catégories en comparant les changements climatiques qui sont systémiques avec les changements globaux induits par l'Homme, qui interviennent à des échelles plus localisées, mais dont l'effet se cumule sur l'ensemble du globe (Rotmans & Vries, 1997). Ce comparatif permettra de mettre en évidence que ces deux catégories sont intrinsèquement liées et donc indissociables (Rotmans & Vries, 1997), de fait les causes et les conséquences des changements globaux sont souvent interdépendantes et confondantes.

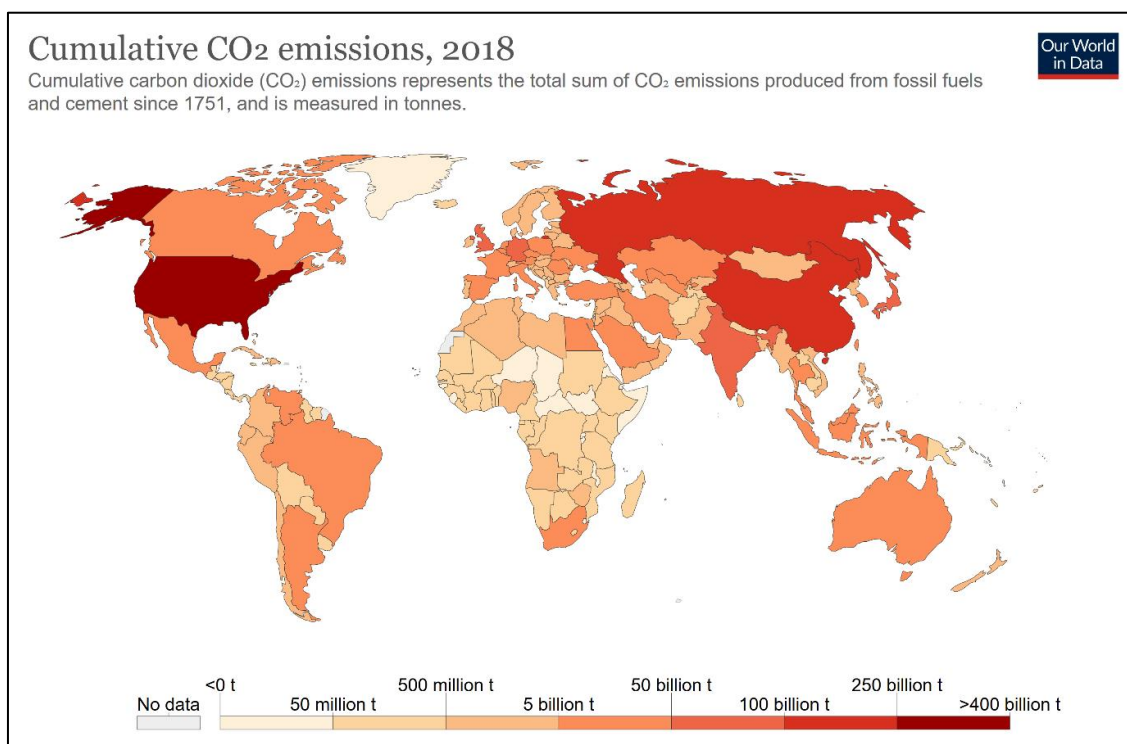


**Figure 2. Représentation schématique des différents types de changements globaux.** Cumulatifs (a,b) et systémiques (c) proposés par Turner et al., 1990. (Source : Turner et al., 1990)

### **Le changement climatique**

Le changement climatique est un changement global systémique se traduisant par une modification sur le long terme des conditions climatiques et météorologiques du système terrestre (Turner et al., 1990). Ce phénomène était connu bien avant l'apparition du concept des changements globaux dans les années 90, notamment depuis l'antiquité pendant laquelle certains penseurs évoquaient déjà la possibilité que l'Homme en déforestant et en irriguant les terres puisse modifier la température et les profils de précipitations localement (Fleming, 1999). Plusieurs siècles plus tard, en 1827, le mathématicien-physicien Joseph Fourier publie des travaux dans lesquels il explique que l'énergie reçue à la surface de la Terre sous la forme de rayonnements solaires peuvent ne pas être totalement renvoyée dans l'espace et être partiellement piégée dans l'atmosphère, il présente ce phénomène en faisant une analogie

avec une serre en verre qui retient la chaleur provenant du rayonnement solaire (Fleming, 1999). C'est à cette époque qu'apparaît les concepts d'effet de serre « greenhouse effect » et de gaz à effet de serre (Fleming, 1999). Au début des années 1900, des géologues découvrent par l'étude des couches géologiques dans les Alpes que l'histoire de la Terre est ponctuée de transitions entre des ères glaciaires et interglaciaires (Penck & Brückner, 1909), et que nous vivons dans l'une de ces ères interglaciaires qui prendra plus tard le nom d'Holocène (Corlett, 2015). Enfin, après les trois grandes révolutions industrielles, l'idée que la Terre se réchauffe plus rapidement sous l'effet de l'intensification de l'activité humaine devient de plus en plus évidente (Camill, 2010). La consommation énergétique de l'Homme commence à rapidement augmenter à partir du XIX<sup>e</sup> siècle, à telle point que la consommation énergétique par individu est multipliée par 93 entre 1860 et 1991 en conséquence de l'accroissement des populations et du progrès technologique toujours plus demandeur en énergie (Cohen, 1995; Camill, 2010). Conjointement, l'émission de gaz à effet de serre par l'Homme augmente, l'équivalent de 35 milliards de tonnes de carbones est relâché dans l'atmosphère chaque année sous forme de CO<sub>2</sub> depuis 2017 (Ritchie & Roser, 2017; IPCC, 2019a), **Figure 3**.



**Figure 3. Cumul de l'émission de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) émis par chaque pays par l'utilisation d'énergie fossile entre 1751 et 2018.** L'intensité de la couleur rouge reflète la quantité de CO<sub>2</sub> émise en milliards de tonnes de 0 à >400 milliards de tonnes.

(Source : Global Carbon Project (GCP); Carbon Dioxide Information Analysis Centre (CDIAC); OurWorldinData.org)

Les conséquences des changements climatiques sont nombreuses, la plus connue demeure l'augmentation globale des moyennes de températures enregistrées à la surface de la Terre et dans les océans (IPCC, 2019a, 2019b). Ces dernières ont augmenté de  $+1,5^{\circ}\text{C}$  en moyenne par rapport à la période 1850-1900 pour les environnements terrestres (IPCC, 2019a) et de  $+1^{\circ}\text{C}$  en moyenne à la surface des océans (IPCC, 2019b), ces perturbations entraînent un stress thermique à large échelle pouvant avoir un impact sur la santé des organismes y compris pour l'Homme (Kim, Kabir, & Ara Jahan, 2014).

La perturbation des températures terrestres est également impliquée dans d'autres changements climatiques de grande envergure telle que l'augmentation du niveau de la mer et des océans qui est liée au réchauffement de ces derniers, ce qui provoque une expansion thermique des masses d'eau et la fonte des couches de glace continentales qui vont également contribuer à l'élévation du niveau des eaux (IPCC, 2019b). Ce phénomène intervient à chaque cycle de transition entre une ère glaciaire et une ère interglaciaire et se retrouve accéléré à notre époque par le contexte de l'Anthropocène (IPCC, 2019b). Ainsi le niveau global des mers et des océans a augmenté en moyenne de 230 mm entre 1880 et 2013 (Legresy, 2014; IPCC, 2019b), avec une accélération entre 1993 et 2020 représentée par une augmentation de 94 mm du niveau des eaux (NASA, 2020).

Enfin, le dernier exemple de changements climatiques également liés à l'élévation des températures terrestres est l'augmentation de la fréquence des événements climatiques et météorologiques extrêmes, **Figure 4**, qui interviennent en raison des vagues de chaleur répétées et plus intenses que subit la Terre (Kim et al., 2014). Là encore, la perturbation des températures terrestres entraîne une accélération dans la survenue d'un ensemble d'événements climatiques rares tels que des perturbations dans les profils de précipitations menant



**Figure 4. Un exemple d'évènement climatique extrême présenté par Camill, 2010. Des dommages matériels liés à l'inondation de Nashville, USA en mai 2010 à la suite d'un épisode de fortes précipitations (49 cm d'eau tombés en 2 jours). Des épisodes de pluies extrêmes rares survenant de plus en plus régulièrement avec le réchauffement climatique. (Source : Camill, 2010)**

localement à des inondations, l'augmentation de la durée d'épisodes de sécheresse, canicules, tremblements de terre, tsunamis, cyclones tropicaux, etc. ; (Arndt, Baringer, & Johnson, 2010; Rahmstorf & Coumou, 2011; Kim et al., 2014). Des événements climatiques et météorologiques qui ont de lourdes conséquences sur les écosystèmes mondiaux ainsi que sur les populations humaines et animales (Camill, 2010; Kim et al., 2014).

### *L'activité humaine*

Tout au long de son histoire, l'Humanité a été marquée par des événements ayant profondément changé les taux de natalité et de mortalité (Lee, 2003). Ces transitions démographiques ont été multiples et principalement liées à l'amélioration des conditions de vie des individus, notamment avec l'évolution des technologies (Bongaarts, 2009). À cet égard, nous sommes passés de 1 milliard d'individus en 1800 à plus de 7,7 milliards en 2020 (Camill, 2010; Roser, Ritchie, & Ortiz-Ospina, 2013), avec un effectif global attendu de plus de 9 milliards en 2050 si la tendance actuelle reste inchangée (Camill, 2010; Roser et al., 2013). Cet accroissement populationnel et l'intensification des activités qui en découlent ainsi que l'évolution des normes sociales de consommation et du niveau de richesse, sont moteurs d'un ensemble de changements globaux cumulatifs se répercutant sur l'ensemble du globe (Turner et al., 1990; Camill, 2010). Ces changements globaux d'origines anthropiques peuvent être différenciés en trois catégories. (i) La pollution, ou l'ensemble des substances émises par les populations humaines dans l'environnement ou dans l'atmosphère (Camill, 2010). (ii) L'usage des terres, ou l'ensemble des modifications physiques (*e.g.* urbanisation, agriculture) imprimées aux écosystèmes par l'Homme pour répondre aux besoins des populations humaines (FAO, 2020). (iii) La connexion des continents par la globalisation des échanges commerciaux (Findlay & O'Rourke, 2007).

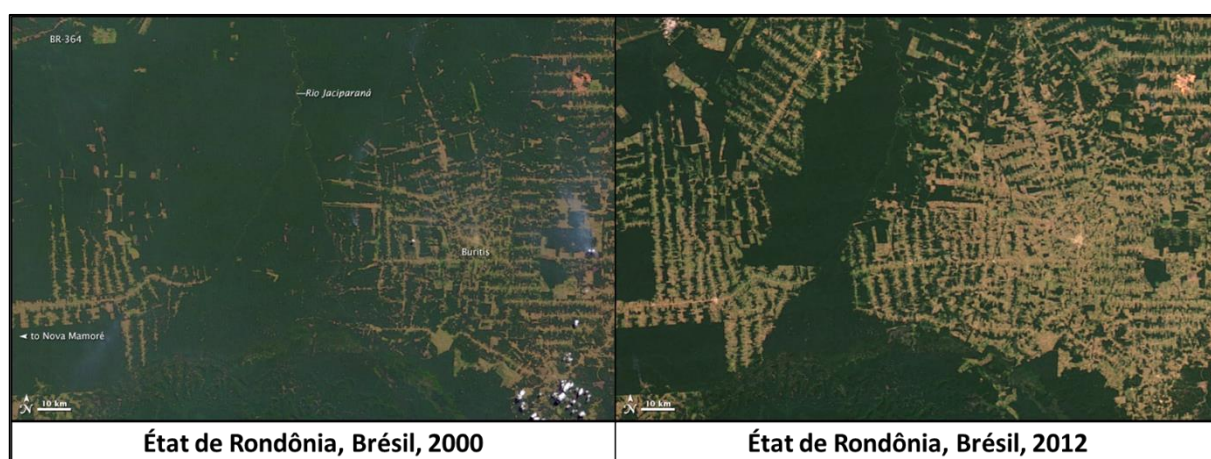
En ce qui concerne la pollution, les gaz à effet de serre ne sont pas les seuls éléments émis par les activités humaines qui contribuent aux changements globaux, l'émission de substances réduisant la couche d'ozone ou « ozone-depleting substances » (ODS) (*e.g.* chlorofluorocarbones, hydrochlorofluorocarbones et halons ; de Jager et al., 2005), contribuent également au réchauffement planétaire en diminuant la capacité de l'atmosphère terrestre à renvoyer l'énergie provenant des rayonnements solaires qui se retrouve piégée par effet de serre (de Jager et al., 2005). De même, la combustion d'énergie fossile (*e.g.*

charbon et pétrole) ainsi que les industries minières et automobiles émettent des polluants atmosphériques toxiques, comme des métaux lourds (*e.g.* cadmium, mercure et plomb) et des oxydes d'azotes qui ont un impact en santé humaine et animale (Baldauf, Lane, & Marote, 2001; Camill, 2010; Pandey, Agrawal, & Singh, 2014). À une échelle plus restreinte, la production d'éléments synthétiques (*e.g.* plastiques et autres produits chimiques) issus de l'exploitation du pétrole depuis le XX<sup>e</sup> siècle a des conséquences sur les écosystèmes aquatiques, notamment dans les océans et mers où ils se retrouvent accumulés (Camill, 2010; Ryan, Dilley, Ronconi, & Connan, 2019). Dans ce contexte, les écosystèmes aquatiques et principalement les milieux d'eau douce sont particulièrement menacés, car historiquement utilisés pour l'élimination de déchets et effluents issus de l'industrie (*e.g.* déchets plastiques, métaux lourds) et des usines de traitement des eaux usées (*e.g.* contaminants organiques et inorganiques) ; (Watson & Lawrence, 2003; Akpor, Otohinoyi, Olaolu, & Aderiye, 2014; Blettler, Abrial, Khan, Sivri, & Espinola, 2018). Ces environnements sont également pollués par les exploitations agricoles qui utilisent de plus en plus de pesticides et engrais chimiques enrichis en azotes qui se retrouvent assimilés par ruissellement dans les milieux aquatiques (Camill, 2010), une pollution environnementale qui avec l'émission de CO<sub>2</sub> d'origine anthropique, perturbe les cycles naturels du carbone et de l'azote et contribue à des phénomènes de grande envergure telle que l'acidification des océans et des mers (Zeebe, 2012).

En ce qui concerne l'usage des terres, l'espèce humaine fait partie des espèces qualifiées « d'ingénieurs d'écosystèmes » (*i.e.* capable de modifier, de créer ou de détruire des habitats ; Jones, Lawton, and Shachak, 1997). Avec la transition démographique que nous connaissons ces dernières années (Roser et al., 2013), les besoins en nourriture et en logement n'ont cessé d'augmenter, menant à l'intensification de l'anthropisation des paysages, de l'exploitation des terres, de l'eau et d'autres ressources naturelles par des activités telles que l'agriculture, la pêche, l'élevage, le transport et l'industrie. Ces activités ont été multipliées par plus de 10 ces 200 dernières années (Rotmans & Vries, 1997; Camill, 2010). C'est pourquoi beaucoup d'environnements naturels notamment forestiers et désertiques ont été transformés en environnements anthropisés tels que des villes, des zones d'élevages et des exploitations agricoles (Camill, 2010), **Figure 5**. Bien que le taux de déforestation ait diminué ces dernières années, environ 10 millions d'hectares de forêts sont encore déforestés



chaque année depuis 2015 contre 12 millions d'hectares par ans entre 2010 et 2015 (FAO, 2020), la majorité de ces environnements sont transformés pour des services sociaux (*e.g.* tourisme, éducation, divertissement ; FAO, 2020). À l'échelle du globe, sur les 130 milliards de km<sup>2</sup> de terres non gelées existantes, entre 70 et 76% sont exploités par l'Homme, principalement pour de l'élevage (30-47%) et pour l'agriculture (12-14%) (IPCC, 2019a). Tout comme la pollution, l'usage intensif des terres pour des activités telles que l'agriculture peut contribuer à l'accélération de catastrophes naturelles de grande ampleur telle que la désertification (*i.e.* raréfaction de l'eau et fortes sécheresses ; IPCC, 2019a) et la dégradation des habitats (*i.e.* érosion des sols, perte de végétation, incendies ; IPCC, 2019a), des phénomènes qui tout comme l'acidification des océans sont induits par les changements climatiques et accélérés par l'activité humaine (Camill, 2010; IPCC, 2019a).



**Figure 5. Exemple de déforestation en milieu tropical dans l'état de Rondônia dans l'ouest du Brésil entre 2000 et 2012.** Sur les 208 000 km<sup>2</sup> de forêt tropicale, un total d'environ 67 764 km<sup>2</sup> ont été défrichés depuis le début de l'exploitation jusqu'en 2003, faisant de Rondônia l'une des régions les plus déboisées d'Amazonie.

(Source : NASA.gov ; Goddard Space Flight Center Scientific Visualization Studio)

En plus de l'intensification de l'usage des terres, l'intégration de systèmes économiques nationaux dans un système économique mondial a mené à l'intensification des flux internationaux de marchandises, de personnes et d'animaux (Findlay & O'Rourke, 2007), un phénomène nommé la mondialisation (Lee, 2004; Findlay & O'Rourke, 2007). Cette mondialisation se traduit par une augmentation significative des échanges commerciaux entre les pays qui ont été multipliés par plus de 40 par rapport aux années 1913 (Ortiz-Ospina & Beltekian, 2014). En conséquence, plusieurs pays du monde ont connu un essor économique sans précédent, car la valeur des biens exportés qui représentait 10% de la production

mondiale en 1870, représente désormais 25% de la production mondiale (Hulme, 2009; Ortiz-Ospina & Beltekian, 2014). La mondialisation a également mené à une nouvelle perception de l'espace physique et territorial avec le passage d'échanges transfrontaliers à des échanges globalisés, ainsi qu'à une accélération du transit de l'information dans le monde (Lee, 2004). Indirectement, ces divers changements ont également rendu les limites géographiques des écosystèmes moins restrictives pour les espèces qui y vivent, notamment celles associées aux populations humaines telles que les animaux d'élevages qui transitent rapidement dans ce monde de plus en plus interconnecté (Hulme, 2009; Capinha, Essl, Seebens, Moser, & Pereira, 2015; IPCC, 2019a). C'est pourquoi ces changements génèrent un contexte propice à la dissémination d'espèces exotiques dans le monde (*i.e.* une espèce non native de l'environnement dans lequel elle est introduite) (Ogden et al., 2019).

### **Les écosystèmes d'eau douce, un exemple des conséquences des changements globaux sur les écosystèmes**

Les milieux aquatiques d'eau douce sont des environnements qui comme leur nom l'indique, sont composés d'eau ayant une faible concentration en sel dissous, généralement moins de 0,05% (Cavin, 2017). Ils constituent un réseau d'environnements aquatiques faisant la transition entre les eaux issues de précipitations sur les terres et les environnements marins (Cavin, 2017). Les environnements d'eau douce sont un exemple pertinent des conséquences des changements globaux sur les écosystèmes, car ils sont particulièrement impactés par les stress environnementaux induits par les changements globaux (Vorismarty et al., 2010; Blettler et al., 2018; Canning & Death, 2019; Tickner et al., 2020). Bien que ces environnements ne constituent que 0,8% de la surface de la Terre, ces derniers abritent une importante part de la biodiversité mondiale, environ 10% de toutes les espèces connues de l'Homme vivent en milieux d'eau douce incluant 1/3 de toutes les espèces connues de vertébrés (Strayer & Dudgeon, 2010) et au moins 40% de toutes les espèces connues de poissons (Dudgeon et al., 2006). Compte tenu de ces deux caractéristiques, les milieux d'eau douce sont de bons indicateurs de l'état de santé des écosystèmes dans le contexte des changements globaux (Canning & Death, 2019). De nos jours, 46% de ces environnements sont catégorisés comme étant vulnérables ou en danger selon l'union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) (Janssen et al., 2016), ce qui signifie que ces environnements ont perdu des



caractéristiques biotiques (*i.e.* interactions entre organismes) ou abiotiques (*i.e.* facteurs physico-chimiques) nécessaires à leur maintien (Janssen et al., 2016).

Ces chiffres alarmants nous amènent à la première conséquence des changements globaux qui est la diminution globale de la biodiversité, elle constitue à elle seule l'un des défis les plus importants que l'humanité aura à résoudre pour ce XXI<sup>e</sup> siècle (Rands et al., 2010; Cardinale et al., 2012; Waldron et al., 2017). Dans le contexte de l'anthropocène et avec toutes les perturbations environnementales qui lui sont associées, nous vivons une sixième crise d'extinction majeure, l'une des plus sévères que la Terre ait connue en termes de rapidité (Ceballos, Ehrlich, & Dirzo, 2017). Cette perte de biodiversité globale se traduit par une diminution de la variété de gènes, d'espèces et de traits fonctionnels (*i.e.* caractéristique morpho-physio-phénologique influant sur la capacité d'un organisme à survivre et à se développer dans son environnement ; Violle et al., 2007) dans les écosystèmes altérés et leur communauté d'organismes (Cardinale et al., 2012). Elle a pour conséquence de déstabiliser les écosystèmes, car elle diminue la capacité des organismes localement présents à contribuer aux divers cycles biochimiques (*e.g.* carbone, azote) essentiels au fonctionnement des écosystèmes (Cardinale et al., 2012; Hill & Griffiths, 2017). Les invasions biologiques (*i.e.* une espèce se propageant rapidement et devenant dominante dans un environnement qui lui était auparavant inaccessible ; Valéry, Fritz, Lefeuvre, and Simberloff, 2008), sont dans ce contexte souvent considérées comme la cause majeure du déclin global de la biodiversité (Lowry et al., 2012; Ogden et al., 2019). Selon l'IUCN, sur les 29 500 espèces décrites et associées aux écosystèmes d'eau douce, 27% d'entre elles sont menacées d'extinction, notamment les tortues (62%) et les gastéropodes (47%) d'eau douce (Collen et al., 2014; IUCN, 2020; Tickner et al., 2020). La crise de biodiversité actuelle ne peut être plus sévère que dans ces milieux, les espèces y disparaissent trois fois plus vite que les espèces terrestres et marines principalement en raison de leur capacité de dispersion limitée (Tickner et al., 2020) et du fait que ces espèces sont majoritairement endémiques (*i.e.* dont la répartition est restreinte à une zone géographique très limitée) (Dudgeon et al., 2006; Tickner et al., 2020).

La perte de biodiversité est liée aux deux autres conséquences des changements globaux sur les écosystèmes d'eau douce qui sont la modification de la distribution spatiale des espèces résultant de l'altération des écosystèmes voire de leur destruction (Dudgeon et al., 2006; Reid et al., 2019). Nous avons vu que les milieux d'eau douce sont

disproportionnellement riches en termes de biodiversité par rapport à la surface terrestre qu'ils occupent (Dudgeon et al., 2006; Strayer & Dudgeon, 2010), de fait, ces écosystèmes sont généralement surexploités par l'Homme pour les divers services écologiques qu'ils apportent (*e.g.* pêche, eau, agriculture, transport, élimination des déchets ; Reid et al., 2019). Ces environnements constituent même une ressource économique importante pour notre espèce (Costanza et al., 1997). Conséquemment, l'urbanisation, l'agriculture et la modification des réseaux hydrographiques contribuent à la fragmentation des écosystèmes d'eau douce (Bond, Lake, & Arthington, 2008; Reid et al., 2019). Les changements climatiques sont également en cause dans ce phénomène, notamment l'élévation des températures et les événements extrêmes associés tels que les sécheresses et la désertification (Reid et al., 2019; Tickner et al., 2020). Ces altérations ont pour effet de modifier la distribution locale des espèces d'eau douce ainsi que leur dynamique (Reid et al., 2019) en limitant physiquement la capacité des organismes présents à se disperser dans leur environnement (Strayer & Dudgeon, 2010) où en rendant les caractéristiques de l'habitat incompatible avec la survie d'une espèce (Comte, Buisson, Daufresne, & Grenouillet, 2013). En dehors de ces changements physiques, la pollution contribue grandement à l'altération des écosystèmes d'eau douce, notamment l'émission d'éléments synthétiques tels que les microplastiques (Blettler et al., 2018), la contamination des eaux par des organismes notamment des bactéries et algues dont certaines peuvent être toxique ou pathogènes pour l'Homme (*i.e.* pouvant provoquer des maladies) (Giller & Malmqvist, 1998; Rodriguez-Tapia & Morales-Novelo, 2017). Enfin, les transports associés aux activités humaines constituent l'une des plus grandes menaces pour les écosystèmes d'eau douce à deux niveaux. D'une part, avec la pollution par les substances émises dans l'environnement par ces transports (Reid et al., 2019). Et d'autre part, avec l'introduction volontaire ou non de nouvelles espèces par l'eau de ballast ou des activités telles que l'aquaculture et l'aquariophilie, qui peuvent résulter en des invasions biologiques (Cowie & Robinson, 2003; Clusa, Miralles, Basanta, Escot, & Garcia-Vazquez, 2017) et grandement menacer la biodiversité locale (Ogden et al., 2019).

Quels que soient les changements globaux en cause, ces divers stress environnementaux que subissent les organismes d'eau douce peuvent, en fonction de leurs traits fonctionnels et traits d'histoire de vie, mener à l'extinction d'une espèce localement ou à l'introduction et la prolifération excessive de nouvelles espèces, des phénomènes

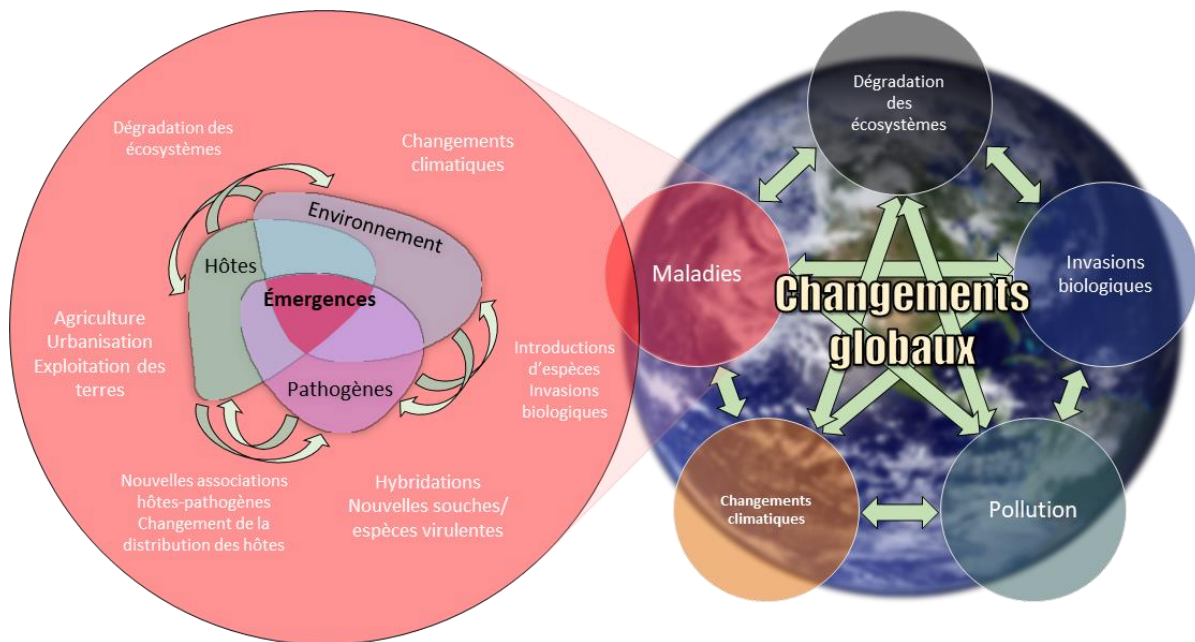
contribuant à l'altération des écosystèmes (Pereira et al., 2010; Cardinale et al., 2012; Capinha et al., 2015). Ce sont des concepts que nous traiterons en détail dans le premier chapitre de ce manuscrit. En ce qui concerne les milieux d'eau douce dans leur ensemble, les changements globaux notamment anthropiques diminuent la qualité de l'eau de ces environnements (Giller & Malmqvist, 1998; Blettler et al., 2018; Tickner et al., 2020) pouvant constituer un risque sanitaire pour l'Homme (Mackenbach, 2007).

## 2. Les changements globaux et la parasitologie

### a. Un risque infectieux grandissant

Tout comme notre espèce et les espèces animales et végétales que nous exploitons transitent dans ce monde de plus en plus interconnecté et anthropisé, les pathogènes qui sont associés à ces espèces y compris la nôtre, voient leur distribution spatiale tout autant perturbée (Jones et al., 2008; Morse et al., 2012; Destoumieux-Garzon et al., 2018). Ces pathogènes circulent maintenant dans un réseau globalisé dans lequel les frontières naturelles et nationales ne constituent plus une limite à leur dissémination (Vittecoq et al., 2014). En effet, les pathogènes de l'Homme ont évolué à ses côtés à travers les différentes transitions démographiques ayant marqué l'histoire de l'Humanité (Picheral, 1996). Les évolutions dans nos déplacements, notre consommation et notre exploitation des terres ont donné lieu au cours de l'histoire à d'importants changements de contexte sanitaire et donc à d'importants changements des taux de mortalité des populations humaines. Ces événements portent le nom de grandes transitions épidémiologiques ou sanitaires, et ont historiquement précédé toutes les périodes de grandes transitions démographiques (Orman, 1971; Picheral, 1996; Zuckerman, Harper, Barrett, & Armelagos, 2014). À l'heure de l'anthropocène et avec les changements globaux qui le caractérisent, nous vivons la troisième de ces transitions épidémiologiques, celle des émergences, **Figure 6** (Zuckerman et al., 2014). En effet, cette transition épidémiologique est marquée par une recrudescence globale des cas d'émergences et de réémergences de maladies infectieuses (*i.e.* causée par un agent pathogène) et non infectieuses (*i.e.* qui ne sont pas liées à un agent pathogène) à l'échelle planétaire (Destoumieux-Garzon et al., 2018). Ces événements d'émergences et/ou de réémergences se

traduisent par une augmentation significative de l'incidence d'une maladie (*i.e.* du nombre de nouveau cas recensé sur une période donnée) dans la population d'une région à une période donnée (Morse, 1995; Toma & Thiry, 2003).



**Figure 6. Schématisation du réseau d'interactions entre les différents facteurs à l'origine des changements globaux favorisant les émergences de maladies infectieuses dans le monde.** (Modifié de : Ghelardini et al., 2016, <http://survivel.cultu.be/global-change> ; Gianni et al., 2019)

Pour illustrer cette troisième transition épidémiologique, les indicateurs de santé tels que les DALYs pour « disability-adjusted life years » ou nombre d'années de vie corrigée du facteur d'invalidité, permettent de quantifier la perte globale sur les populations humaines liées à cette recrudescence de maladies, en se basant sur la somme d'années de vie humaine perdue à la suite d'un décès prématuré (*i.e.* YLLs) et sur le nombre d'années de vie vécues en étant atteint par l'une de ces maladies (*i.e.* YLDs), (Hay et al., 2017). En 2016, les maladies non infectieuses ont causé une perte de 1,468 milliard de DALYs, contre 1,074 milliard dans les années 90 (Hay et al., 2017). Des régions en développement comme l'Afrique subsaharienne apparaissent comme étant particulièrement impactées par les émergences de ces maladies non infectieuses avec environ 151,3 millions de DALYs en 2017 contre environ 90,6 millions de DALYs en 1990 (Bigna & Noubiap, 2019). Ceci en raison de l'augmentation de facteurs de risques dans ces régions tels que l'alimentation non équilibrée, l'obésité, la réduction de l'activité physique, l'hypertension et la pollution de l'air (Bigna & Noubiap, 2019).

En ce qui concerne les maladies infectieuses auxquelles nous allons nous intéresser dans ce manuscrit, elles peuvent être différenciées en cinq types en fonction de l'agent pathogène qui en est la cause, ce qui implique également des méthodes de lutte adaptées (Dimijian, 2000). (i) Les maladies virales pour lesquelles la vaccination reste le meilleur moyen de lutte. (ii) Les maladies bactériennes qui peuvent être traitées par des antibiotiques (Dimijian, 2000). (iii) Les maladies fongiques qui peuvent être traitées par des fongicides (Dimijian, 2000). (iv) Les maladies parasitaires, pour lesquelles les stratégies de lutttes reposent sur la médication (*e.g.* l'ivermectine qui est un antihelminthique et l'artémisinine qui est un anti-malarique) ou l'élimination des espèces vectrices pour les maladies vectorielles. (v) Et les maladies à prions, provoquées par des protéines devenues pathogènes, qui sont incurables. La totalité de ces maladies représentent moins de 18,57% des 56 millions de décès totaux recensés en 2017 (Ritchie & Roser, 2018), un nombre de décès qui diminue progressivement avec l'avancée de la recherche dans le domaine et avec l'amélioration des conditions sanitaires à l'échelle du globe (Ritchie & Roser, 2018). Entre 1940 et 2004, 335 évènements d'émergence de maladies infectieuses ont été recensés (Jones et al., 2008), démontrant une tendance globale aux émergences ou réémergences de maladies infectieuses dans le monde (Jones et al., 2008; Smith & Guégan, 2010). Parmi ces maladies, les plus mortelles demeurent les maladies provoquant des troubles respiratoires (environ 3,9 millions de décès ; Ritchie and Roser, 2018) dont certaines sont liées à des pathogènes telles que les coronavirus à l'origine des syndromes respiratoires aigu sévère ou SRAS (Chatterjee et al., 2020). Il y a également la tuberculose (environ 1,18 million de décès en 2017), le HIV-AIDS ou sida (environs 950 mille) et la malaria (environs 620 mille) (Ritchie & Roser, 2018). En 2016, l'ensemble des maladies infectieuses ont représenté une perte d'environ 667 millions de DALYs contre 1,114 milliard de DALYs dans les années 90 (Hay et al., 2017). Bien que nous observions une diminution des pertes liées aux maladies infectieuses ces dernières décennies, la vigilance à leur rencontre ne doit pas être relâchée compte tenu du contexte actuel d'émergences et de l'impact sanitaire et sociétal que ces maladies peuvent avoir, comme la pandémie en cours de SARS-CoV-2 nous l'a démontré (Chatterjee et al., 2020).

La majorité des maladies infectieuses (*i.e.* 60,3%) sont causées par des pathogènes zoonotiques (*i.e.* des pathogènes qui se transmettent de l'animal à l'Homme par une exposition directe, indirecte ou par l'environnement) (Jones et al., 2008), parmi elles nous

retrouvons les maladies virales émergentes les plus mortelles comme les SRAS (Chatterjee et al., 2020), les Ebola virus (Bausch & Schwarz, 2014) ou encore les gripes aviaires et autres virus tels que Zika (Gyles, 2008; Destoumieux-Garzon et al., 2018). De même, 17% des maladies infectieuses émergentes sont des « vector-borne diseases » (VBD) ou des maladies transmises à l'Homme par des vecteurs (*i.e.* des hôtes infectés qui transmettent un parasite en se nourrissant de manière non léthale sur un autre hôte ; Lafferty and Kuris, 2002) ou par des hôtes intermédiaires tels que les mollusques (WHO, 2017b). Ce qui complexifie le suivi de ces maladies, car il nécessite des connaissances sur la distribution et la dynamique spatiale et temporelle des populations d'hôtes vecteurs ou d'hôtes intermédiaires ainsi que des hôtes définitifs associés à ces parasites, tout en sachant que l'ensemble de ces dynamiques peuvent être perturbées par les changements globaux en cours (Taylor, Latham, & Woolhouse, 2001; Richards, Lord, Pesko, & Tabachnick, 2009; Blum & Hotez, 2018).

Les maladies infectieuses notamment les zoonoses, et les maladies transmises par des hôtes vecteurs sont de bons exemples de l'interconnexion entre la santé des écosystèmes et celle des organismes qui y vivent en incluant notre espèce, c'est ce raisonnement qui a mené en 2004 à l'apparition du concept « One World - One Health », « un monde - une santé » (Destoumieux-Garzon et al., 2018). Ce nouveau concept à l'instar du concept de la médecine unifiée « One Medicine » inclut la santé des écosystèmes et de la faune sauvage dans la nouvelle stratégie globale de recherche visant à comprendre les interconnexions entre la santé humaine, animale et environnementale par des approches intégratives et transdisciplinaires (OHITF, 2008; Destoumieux-Garzon et al., 2018). L'apparition du concept One Health est particulièrement représentative du contexte sanitaire actuel et des conséquences des changements globaux en cours sur la santé humaine. En effet, depuis 2010 déjà l'idée que la diminution de la biodiversité dans un écosystème puisse être liée à l'émergence de pathogènes était déjà évaluée (Keesing et al., 2010). Bien que cette relation puisse également réduire la transmission d'un pathogène, une perte de biodiversité est plus fréquemment liée à une augmentation de la transmission ceci par divers phénomènes comme une modification de l'abondance en hôtes et vecteurs, une modification du comportement des hôtes, vecteurs et parasites ou une modification de la permissivité de l'hôte au pathogène/parasite (Keesing et al., 2010). Cette corrélation semble être corroborée par une approche de modélisation effectuée sur les données de biodiversité de l'IUCN et sur des

données recensant les derniers cas d'émergences de maladies entre 1960 et 2019 (Morand, 2020). Cette étude met en lumière le rôle de l'élevage intensif dans l'augmentation de la fréquence de ces événements d'émergences de maladies infectieuses, car il a pour effet de diminuer la biodiversité globale (Morand, 2020).

### **b. Le cas des interactions mollusques/parasites**

Le contexte sanitaire actuel est particulièrement focalisé sur les zoonoses émergentes d'origine virale comme nous avons pu le voir avec la pandémie de SARS coronavirus en cours ou les épidémies antérieures d'Ebola virus (Bausch & Schwarz, 2014; Chatterjee et al., 2020). Il en est de même pour les maladies à transmissions vectorielles telles que les maladies transmises par les arthropodes (*e.g.* dengue, malaria et chikungunya ; Kincaid-Smith, Rey, Toulza, Berry, and Boissier, 2017). Cet intérêt contraste avec celui porté aux maladies transmises par les mollusques d'eau douce dont l'impact en santé humaine et animale est tout aussi important (Kincaid-Smith et al., 2017; Sabourin, Alda, Vazquez, Hurtrez-Bousses, & Vittecoq, 2018) et dont la dynamique est grandement influencée par les changements globaux en cours, notamment anthropiques (Subhani et al., 2014; Horak et al., 2015; Sabourin et al., 2018; Tanser, Azongo, Vandormael, Barnighausen, & Appleton, 2018) étant donné que ces maladies évoluent dans les écosystèmes les plus sensibles à ces changements (Canning & Death, 2019; Tickner et al., 2020).

Les maladies transmises par les mollusques d'eau douce font partie de la catégorie plus large des maladies transmises par les mollusques, qui affectent des millions de personnes dans plus de 90 pays (Lu et al., 2018). Ces maladies sont causées par des parasites, principalement des trématodes, mais également des nématodes dont le cycle de vie implique l'infection d'un mollusque terrestre ou aquatique en tant que premier hôte (Sabourin et al., 2018). Parmi ces maladies, celles provoquées par les trématodes représentent à elle seules une perte d'environ 600 millions de DALYs chaque année (Hay et al., 2017) avec plus de 1 milliard de personnes infectées dans le monde (Fürst, Keiser, & Utzinger, 2012; Sabourin et al., 2018). À partir des cycles parasitaires, il est possible de distinguer cinq groupes de maladies transmises par les mollusques (Lu et al., 2018) :



- Celles causées par des nématodes et dont les mollusques jouent le rôle d'hôtes intermédiaires (par opposition à l'hôte définitif qui définit l'hôte dans lequel le parasite atteint son stade adulte et effectue sa reproduction sexuée), **Figure 7** groupe 1.

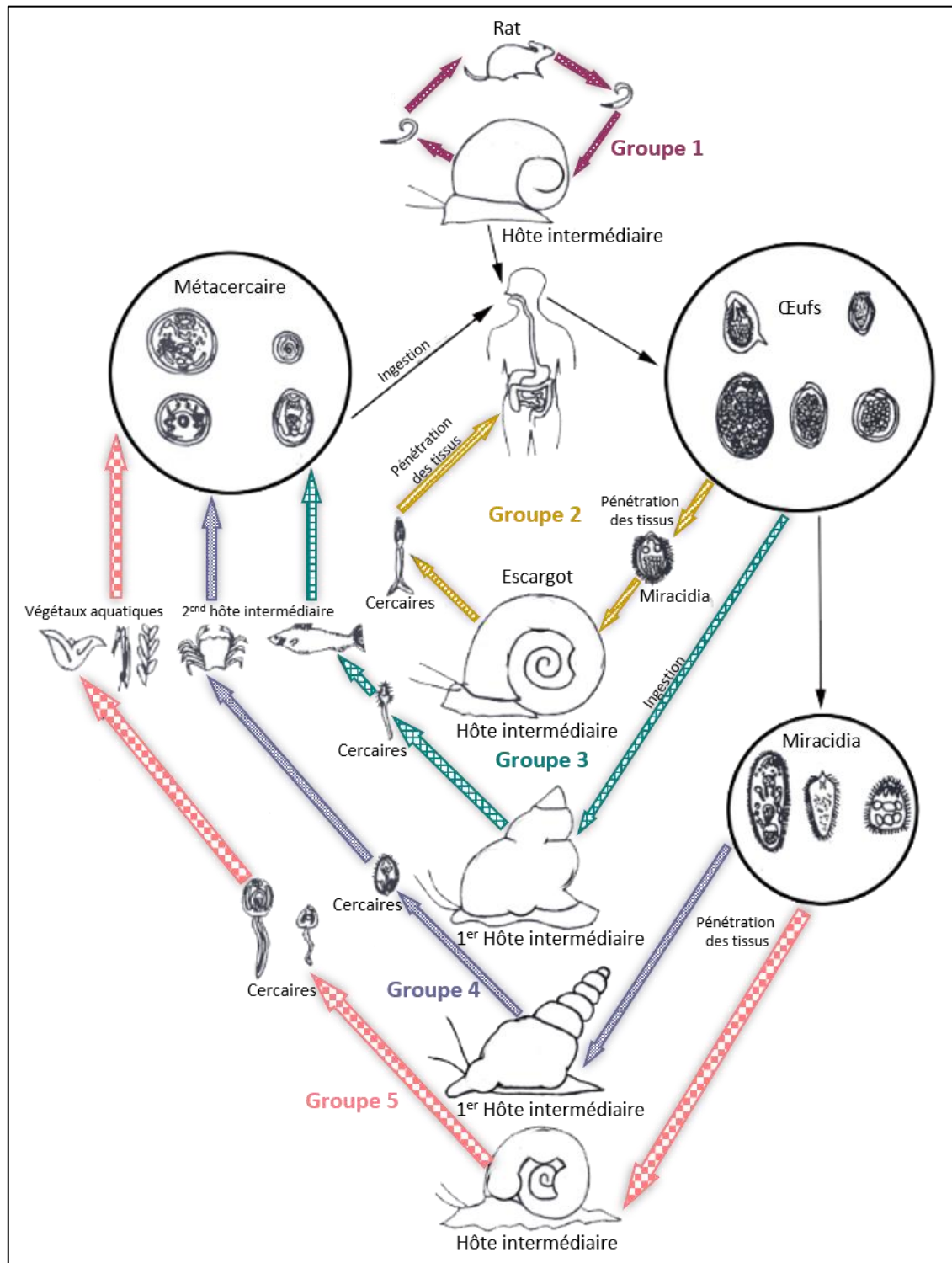
Les quatre autres groupes sont tous caractéristiques de trématodoses ou des maladies provoquées par des trématodes.

- Le second groupe, **Figure 7** groupe 2, concerne les cycles parasites pour lesquels le mollusque est l'unique hôte intermédiaire, il est infecté par un miracidium (*i.e.* un stade larvaire libre nageant du parasite qui va infecter l'hôte intermédiaire par voie transcutanée) (Lu et al., 2018). C'est le cas pour les bilharzioses qui ont fait l'objet de mes travaux de thèse. Une fois le développement intramolluscal du parasite terminé, le mollusque relâche dans l'environnement des cercaires qui sont le stade larvaire nageant qui infectera l'hôte définitif (Lu et al., 2018).
- Le troisième groupe, **Figure 7** groupe 3, concerne les cycles parasites avec plusieurs hôtes intermédiaires, pour lesquels le mollusque est le premier hôte intermédiaire, il s'infecte en ingérant des œufs du parasite, comme c'est le cas pour les chlonorchiasés (Lu et al., 2018).
- Le quatrième groupe, **Figure 7** groupe 4, concerne toujours des cycles pour lesquels le mollusque est le premier hôte intermédiaire, mais dans lesquels il est infecté par voie transcutanée par un miracidium comme c'est le cas du parasite *Paragonimus westermani* (Lu et al., 2018).
- Et le cinquième groupe, **Figure 7** groupe 5, rassemble les cycles parasites dans lesquels le mollusque est l'unique hôte intermédiaire, il est également infecté par des miracidia par voie transcutanée, mais les cercaires qu'il relâchera dans l'environnement s'enkystent sur des végétaux aquatiques sous formes de métacercaires qui sont ensuite ingérés par l'hôte définitif, comme c'est le cas pour la Fasciolose (Lu et al., 2018).

Dès lors nous pouvons constater que le point commun entre tous les cycles de trématodoses (*i.e.* groupe 2 à 5) est que la transmission entre chaque hôte dépend de formes larvaires libres



du parasite qui évoluent en milieux aquatiques (Lu et al., 2018). Cet élément est primordial à prendre en compte dans les stratégies de luttres à l'encontre de ces maladies.



**Figure 7. Schématisation des cinq groupes de maladies transmises par les mollusques.** Avec l'exemple de *Angiostrongylus cantonensis* pour le groupe 1, *Schistosoma* sp. pour le groupe 2, *Clonorchis sinensis* pour le groupe 3, *Paragonimus westermani* pour le groupe 4 et *Fasciola hepatica* pour le groupe 5. (Modifié de : Lu et al., 2018)

Comme pour la plupart des maladies infectieuses nous assistons ces dernières années à une recrudescence d'émergences ou de réémergences de maladies transmises par les mollusques essentiellement en milieux d'eau douce (Blum & Hotez, 2018). Parmi les causes principales de ces émergences nous pouvons citer les invasions biologiques. En effet, les mollusques d'eau douce sont des organismes ayant un fort potentiel d'invasion en raison des interconnexions naturelles des réseaux d'environnements d'eau douce (Lodge et al., 1998; Loo, Keller, & Leung, 2007). À cela s'ajoute le régime de reproduction parthénogénétique de certaines espèces (*i.e.* reproduction monoparentale) qui permet à un seul individu de régénérer une population entière dans l'environnement d'accueil (Gérard, Blanc, & Costil, 2003). Au cours de ces derniers siècles, plusieurs familles de gastéropodes d'eau douce ont été introduites en Europe et Amérique du Nord (*e.g.* *Physidae*, *Thiaridae*, *Planorbidae* et *Lymnaeidae*) par l'intermédiaire de différentes activités anthropiques telles que l'aquaculture, l'aquariophilie, la pêche et le transport en bateau (Cowie & Robinson, 2003; Sabourin, 2018). Parmi ces espèces, certaines sont des hôtes intermédiaires de trématodes infectant l'Homme. C'est le cas notamment de *Galba truncatula* un mollusque d'origine européenne ayant envahi plusieurs pays d'Amérique du Sud (Pointier, 2015). L'introduction de cette espèce sur ce continent est à l'origine de la plus forte hyperendémie connue de fasciolose en Bolivie (Esteban, Flores, Angles, & Mas-Coma, 1999; Meunier et al., 2001). Un autre exemple concerne *Pseudosuccinea columella*, également impliqué dans la transmission de la fasciolose, qui est originaire d'Amérique du Nord et qui a envahi les continents européen, africain et l'Amérique du Sud (Pointier, Coustau, Rondelaud, & Theron, 2007). À titre de dernier exemple, *Melanoides tuberculata* est originaire de l'est de l'Asie et a colonisé le continent américain et les Caraïbes. Ce mollusque est l'hôte intermédiaire de trématodes zoonotiques tels que *Centrocestus formosanus* (Pulido-Murillo, Furtado, Melo, Rabelo, & Pinto, 2018).

Outre l'introduction d'espèces hôtes en dehors de leurs aires natives, l'action de l'Homme sur l'environnement, notamment la modification des réseaux hydrographiques (*i.e.* l'ensemble du réseau de cours d'eau et d'étendues d'eau), par la construction de ponts, barrages et canaux artificiels (Lodge et al., 1998; Sabourin et al., 2018) peut également contribuer à l'émergence locale de trématodoses en créant des habitats favorables à la transmission de ces parasites. Cela a été démontré pour la fasciolose, les bilharzioses et pour

l'opisthorchiase (Esteban et al., 2002; Steinmann, Keiser, Bos, Tanner, & Utzinger, 2006; Ziegler et al., 2013; Sabourin et al., 2018).

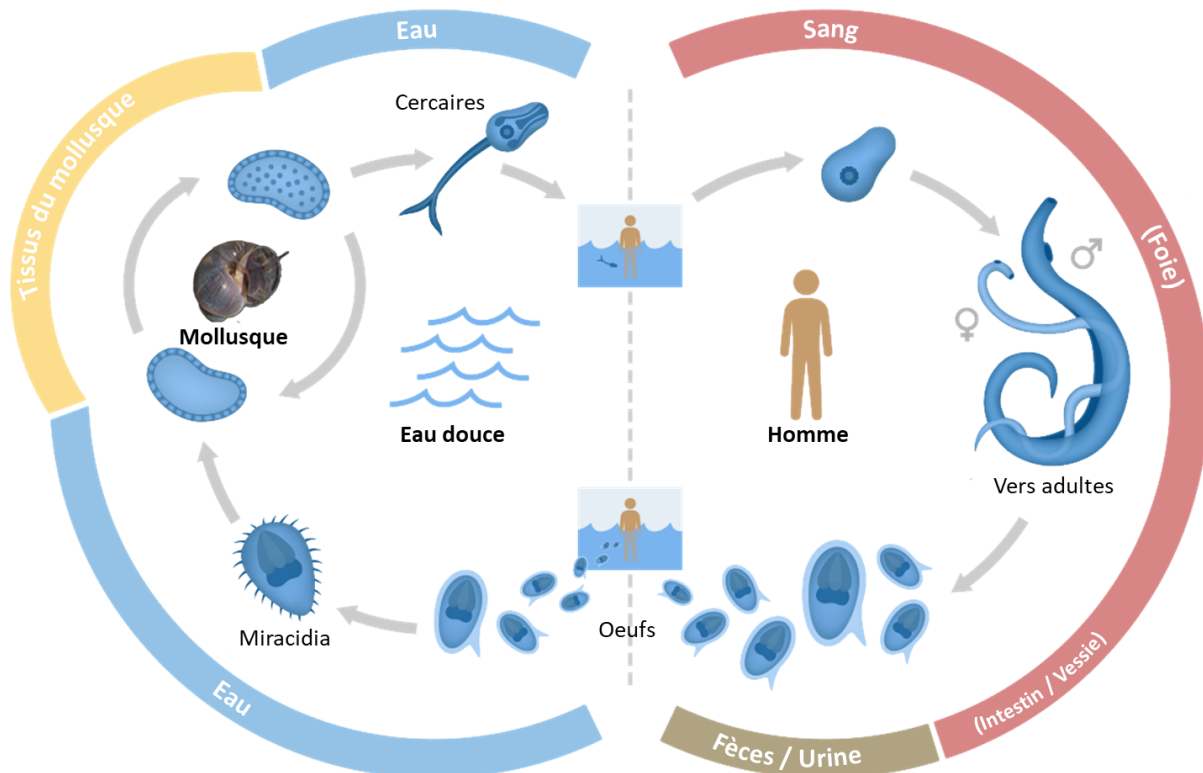
### 3. Du tropical vers le tempéré, le cas de la bilharziose

#### a. Les bilharzioses

La bilharziose est un bon exemple des conséquences des changements globaux sur la dynamique de transmission des maladies transmises par les mollusques d'eau douce (Robinson & Dalton, 2009; Kim et al., 2014). Bien qu'au singulier, la bilharziose décrit en fait un ensemble de maladies tropicales négligées (NTD) causées par des parasites appartenant au genre *Schistosoma*. Cette maladie a été décrite pour la première fois en Égypte au Caire par le parasitologue allemand Theodor Maximilian Bilharz (Bilharz, 1853), qui nommera ces vers plathelminthes « *Distoma haematobium* » lors d'observations de tissus de patients infectés (Bilharz, 1853). Ce sera plusieurs années plus tard que le genre *Schistosoma* (du grec « corps divisé ») sera conservé par la commission internationale de nomenclature zoologique pour classer ces organismes en raison de leur morphologie segmentée particulière (Kincaid Smith, 2018).

Actuellement six espèces de schistosomes sont connues pour infecter l'Homme, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma guineensis* et *Schistosoma mekongi* qui sont responsables des formes intestinales de bilharzioses et *Schistosoma haematobium* responsables de la forme urogénitale de la bilharziose (Boissier, Mouahid, & Mone, 2019). Ces parasites se transmettent en milieux aquatiques d'eau douce au cours d'un cycle dixène (*i.e.* deux hôtes) entre un hôte intermédiaire invertébré, un gastéropode d'eau douce, qui est infecté par un miracidium qui pénètre ses tissus et dans lequel s'effectue la multiplication asexuée du parasite, et un hôte définitif vertébré, notamment l'Homme, infecté par une cercaire qui pénètre ses tissus et dans lequel le parasite effectue sa reproduction sexuée, **Figure 8** (Inobaya, Olveda, Chau, Olveda, & Ross, 2014; Boissier et al., 2019). Ce cycle de vie correspond au groupe 2 de maladies transmises par les mollusques d'eau douce avec un unique hôte intermédiaire et l'infection

transcutanée des deux hôtes impliqués dans le cycle par l'intermédiaire de stades larvaires libres nageant, **Figures 7 et 8** (Lu et al., 2018).



**Figure 8. Cycle de vie dixène de *Schistosoma haematobium*.** Les deux hôtes impliqués dans ce cycle parasitaire s'infectent par l'intermédiaire de stades larvaires libres du parasite. Le miracidium infecte l'hôte intermédiaire mollusque par voie transcutanée. Les hôtes définitifs vertébrés comme l'Homme sont infectés par les cercaires par voie transcutanée également. (Modifié de : Yourgenome.org)

La distribution spatiale des schistosomes est dépendante de celle de leurs hôtes mollusques (Boissier et al., 2019), toutes les espèces de schistosomes ont un spectre d'hôtes ou ensemble d'hôtes définitifs et intermédiaires compatibles spécifique (Boissier et al., 2019). Par exemple, *S. japonicum* infecte des mollusques du genre *Oncomelania* qui sont essentiellement présents en Chine. *Schistosoma mansoni* infecte des mollusques du genre *Biomphalaria* qui sont présents en Afrique centrale et en Amérique du Sud. *Schistosoma haematobium* infecte des mollusques du genre *Bulinus* qui sont essentiellement présents en Afrique (Boissier et al., 2019). En ce qui concerne les hôtes définitifs, les espèces de schistosomes qui infectent l'Homme (e.g. *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. guineensis*) sont connues pour s'hybrider naturellement avec d'autres espèces de schistosomes infectant les ruminants (e.g. *Schistosoma bovis* et *Schistosoma curassoni*) ou des schistosomes de rongeurs

(e.g. *Schistosoma rodhaini*) (Kincaid Smith, 2018; Boissier et al., 2019). Ces espèces hybrides de schistosomes soulèvent la possibilité d'une transmission zoonotique de ces hybrides de l'animal à l'Homme (Boissier et al., 2019) et donc l'intérêt de pratiquer du diagnostic vétérinaire en plus des diagnostics médicaux.

## b. Épidémiologie

Les bilharzioses sont des maladies endémiques dans 78 pays dans le monde, principalement en régions tropicales et subtropicales, notamment, l'Afrique qui rassemble 85% des cas mondiaux de bilharzioses (Kincaid Smith, 2018). Environ 230 millions de personnes sont infectées par un schistosome dans le monde et ces maladies menacent un total d'environ 800 millions de personnes qui vivent en zone d'endémie (WHO, 2018; Boissier et al., 2019). Chaque année, les bilharzioses sont responsables d'une perte estimée entre 1,7 et 4,5 millions de DALYs (Hotez et al., 2014; Hay et al., 2017; Boissier et al., 2019), dont 90% sont liées à des années vécues en étant atteint par l'une de ces maladies (*i.e.* YLDs) et 10% d'années de vies de perdus en raison de mortalité prématurée (*i.e.* YLLs) (Hotez et al., 2014; Boissier et al., 2019). De fait, la bilharziose constitue la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme en termes de mortalité et de morbidité (*i.e.* le nombre d'individus infectés sur une période donnée dans une population donnée) (Hotez et al., 2014; Boissier et al., 2019).

La pathologie de la maladie est, quant à elle, principalement liée à l'accumulation d'œufs de parasites non excrétés qui se retrouve piégés dans les méésentères ou les vaisseaux sanguins en périphérie de la vessie. En l'absence de traitement cette maladie peut entraîner des complications notamment des hépatosplénomégalias, des fièvres, des douleurs abdominales, des urines et diarrhées sanglantes pouvant mener pour les cas les plus sévères à la mort (Ross, Vickers, Olds, Shah, & McManus, 2007; Boissier et al., 2019). Aucun vaccin n'existe à l'encontre de la bilharziose (Boissier et al., 2019). Cependant, ces 40 dernières années, des stratégies de contrôles et d'éradication ont été mises en place par l'OMS à l'encontre des bilharzioses, notamment par le traitement préventif de masse par chimiothérapie, qui consiste à traiter tous les individus présents à proximité d'un foyer de transmission actif (Fenwick & Jourdan, 2016; Hotez, Fenwick, Ray, Hay, & Molyneux, 2018). La molécule active utilisée est le praziquantel (Hotez, Fenwick, Savioli, & Molyneux, 2009; Fenwick & Jourdan, 2016). C'est pourquoi environ 78 millions de personnes ont suivi un

traitement contre la bilharziose en 2018 (WHO, 2020), alors que des estimations prédisent que 218 millions de personnes supplémentaires vivant dans les zones à risque de transmissions devraient être traitées (WHO, 2018; Boissier et al., 2019). Malgré toutes ces mesures, la bilharziose persiste dans certaines régions du monde, et la gestion de ces maladies s'est largement complexifiée avec l'accélération des changements globaux en cours qui perturbent la dynamique de transmission de ces parasites (Kincaid-Smith et al., 2017; Kincaid Smith, 2018). C'est pourquoi la stratégie d'élimination de la bilharziose focalisée sur l'hôte définitif a été revue en 2019 par l'OMS pour être plus intégrative dans un contexte One-Health notamment en prenant en compte le contrôle des hôtes mollusques et des hôtes réservoirs dans l'environnement afin d'éliminer le parasite avant qu'il n'atteigne les populations humaines (WHO, 2020).

### c. Des émergences de bilharzioses dans le monde

Ces dernières années une accélération des cas d'émergences ou de réémergences de bilharzioses a été observée en réponse à plusieurs changements environnementaux d'origine climatique et anthropique. En effet, la transmission des bilharzioses est étroitement liée à l'eau, les personnes les plus à risques étant celles qui pratiquent des activités professionnelles, culturelles ou des divertissements dans les environnements d'eau douce, de fait les zones rurales ayant un accès limité à l'eau potable sont particulièrement menacées (Hotez et al., 2007; Hotez et al., 2009; Kincaid Smith, 2018). Les enfants y sont plus susceptibles d'accumuler une charge parasitaire importante et donc de développer des formes sévères de bilharziose (Stothard, Sousa-Figueiredo, Betson, Bustinduy, & Reinhard-Rupp, 2013). Les changements anthropiques dans les milieux d'eau douce ne sont donc pas sans conséquence sur la transmission de la bilharziose (Steinmann et al., 2006), comme pour beaucoup de trématodoses, les modifications des réseaux hydrographiques par l'Homme (*e.g.* construction de barrages et de canaux d'irrigation) peuvent créer des habitats favorables à la prolifération de mollusques hôtes menant à l'intensification de la transmission de schistosomes tels que *S. haematobium* et *S. mansoni* comme cela a été démontré dans plusieurs pays d'Afrique (*e.g.* Burkina Faso, Cameroun et Sénégal ; Steinmann et al., 2006). Ces constructions peuvent également bloquer la migration de prédateurs naturels des mollusques hôtes et favoriser d'autant plus leur prolifération et donc les risques de transmission (Sokolow et al., 2017). À

l'inverse, les régions s'étant développées en termes d'accès à l'eau potable peuvent connaître une diminution locale de la transmission de la bilharziose étant donné que l'accès aux environnements d'eau douce se fait plus rare (Steinmann et al., 2006).

Toujours en ce qui concerne les altérations de l'environnement par l'Homme, la pollution peut également contribuer localement à l'intensification de la transmission de la bilharziose comme cela a été démontré avec des polluants agrochimiques (*e.g.* fertilisants, pesticides, herbicides ; Halstead et al., 2018; Becker et al., 2020; Hoover et al., 2020). Ces composés sont de plus en plus utilisés en agriculture (Halstead et al., 2018), et une fois rejetés dans les environnements d'eau douce par ruissellement, ils favorisent la prolifération d'algues à la base de l'alimentation de mollusques hôtes, ici *Biomphalaria glabrata*, et donc la prolifération de ces mollusques, menant à une intensification de la transmission du parasite *S. mansoni* (Halstead et al., 2018). Par le même type d'expérimentation, il a été démontré que ces polluants agricoles pouvaient être toxiques pour certaines espèces d'arthropodes prédatrices de mollusques d'eau douce, de fait, ces prédateurs ne peuvent plus réguler les populations de mollusques hôtes qui prolifèrent (Hoover et al., 2020).

Les changements climatiques jouent également un rôle dans la dynamique de transmission des bilharzioses, car ils peuvent modifier les aires de distribution géographiques d'hôtes mollusques (Pedersen et al., 2014; Yang & Bergquist, 2018). Avec l'augmentation des températures en cours, il est à craindre que l'aire de répartition de maladies infectieuses tropicale se décale vers le nord (Kim et al., 2014). Dans ce contexte, plusieurs outils de modélisation ont permis de démontrer ce phénomène, notamment avec la transmission de bilharziose intestinale par le mollusque *Biomphalaria pfeifferi* au Zimbabwe, dont l'aire de répartition devrait augmenter jusqu'en 2050 avec le réchauffement climatique, avant de grandement diminuer pendant les années qui suivront, car les températures prédites deviendront trop élevées pour permettre aux mollusques hôtes de se développer (Pedersen et al., 2014). Des phénomènes similaires ont été identifiés pour les principaux parasites à l'origine des bilharzioses humaines (*i.e.* *S. haematobium*, *S. mansoni* et *S. japonicum* ; Yang and Bergquist, 2018).

Les flux migratoires et touristiques en provenance des zones d'endémie ainsi que les flux d'animaux, notamment l'introduction de mollusques d'eau douce dans de nouveaux environnements par des activités telles que l'aquariophilie, l'aquaculture, le commerce et le



tourisme, constituent divers moyens d'introduction de schistosomes dans de nouvelles localités (Charbonnel et al., 2002; Perez-Saez et al., 2015; Panagiotopoulos, 2018). L'invasion de l'île de Madagascar par *B. pfeifferi* en est un bon exemple. Ce mollusque a colonisé l'île après avoir été introduit suite à une occupation humaine datant de plusieurs siècles, probablement par bateau lors des vagues successives de colonisation de l'île (Charbonnel et al., 2002). Cette introduction est à l'origine d'émergences locales de *S. mansoni*, le parasite le plus prévalent dans ces populations de mollusques à l'heure actuelle. Ce dernier a été introduit localement par des colons infectés provenant de zones d'endémie de bilharziose intestinale (Charbonnel et al., 2002). Enfin, les flux de populations humaines en provenance de zones d'endémie constituent l'unique moyen d'introduction de schistosomes dans le monde (Perez-Saez et al., 2015; Panagiotopoulos, 2018), l'exemple le plus actuel d'émergence de bilharziose lié à ce facteur étant l'émergence de bilharziose urogénitale en Corse (Holtfreter, Mone, Muller-Stover, Mouahid, & Richter, 2014; Boissier, Mone, et al., 2015; Boissier et al., 2016).

### Une émergence en cours : La bilharziose en Corse

Officiellement, la bilharziose humaine était déclarée éradiquée du continent européen après le dernier cas traité de bilharziose urogénitale autochtone recensé dans le sud du Portugal en 1967 (Boissier, Mone, et al., 2015). Les cas diagnostiqués en Europe les années qui suivirent (*i.e.* 1465 entre 1997 et 2010 ; Lingscheid et al., 2017) étaient des cas importés par des personnes ayant séjourné dans des zones d'endémie de bilharziose (Lingscheid et al., 2017). En France ce sont environ 2000 cas importés de bilharziose qui sont recensés chaque année (Noel et al., 2018), et la maladie étant asymptomatique pour la plupart des cas et n'étant pas à déclaration obligatoire avant 2016 (Ramalli et al., 2018), ces personnes constituent un risque difficilement quantifiable d'importation de la bilharziose en Europe (Kincaid Smith, 2018).

C'est alors qu'en janvier 2014, une famille est diagnostiquée positive à *S. haematobium* à l'hôpital de Düsseldorf en Allemagne (Holtfreter et al., 2014). Quelques mois plus tard, en mars 2014, une autre famille est diagnostiquée positive à ce même parasite à l'hôpital de Toulouse en France (Berry et al., 2014). L'analyse parasitologique des urines de ces patients venus consulter pour des hématuries (*i.e.* présence de sang dans les urines) révélera la



présence d'œufs viables du parasite *S. haematobium*, certaines de ces personnes seront également testées positives en test sérologique (Berry et al., 2014). Les mois qui suivent, un total de 6 cas sont identifiés après une analyse d'urine (Berry et al., 2014), la particularité de ces cas étant qu'aucune de ces personnes n'avaient séjourné dans une zone d'endémie de bilharziose les mois précédant l'apparition des symptômes. Cependant, toutes ces personnes présentent un point commun, elles ont toutes séjourné dans la région de Porto-Vecchio dans le sud-est de la Corse l'été 2013 (Boissier et al., 2016). Ces individus ont tous fréquenté un site de baignade réputé, la rivière Cavu dans la région de Porto-Vecchio, qui accueille entre 3000 et 5000 personnes par jours pendant la saison estivale (Berry et al., 2014; Boissier et al., 2016). Ce furent les premiers cas de bilharziose urogénitale autochtone identifiés en Corse.

Les années qui suivent, plus de 100 cas de bilharziose urogénitale contractée en Corse sont identifiés en France, Allemagne et Espagne, tous compatibles avec une infection datant de l'été 2013 (Berry et al., 2014; Holtfreter et al., 2014; Boissier, Mone, et al., 2015; Berry et al., 2016; Boissier et al., 2016). Ces cas ont été diagnostiqués à l'occasion d'une campagne de diagnostic menée sur plus de 37 000 personnes entre 2014 et 2015 à la suite de l'alerte sanitaire lancée par « L'European Center for Disease Prevention and Control » (ECDC) (Boissier, Kincaid-Smith, et al., 2015). La présence de mollusques hôtes intermédiaires sur les sites de baignade sera investiguée, et le mollusque *Bulinus truncatus* sera identifié dans les sites correspondants : ce mollusque étant l'hôte intermédiaire principal de *S. haematobium* (Boissier et al., 2016). Ironiquement, *B. truncatus* avait déjà été identifié sur l'île en 1962, et à l'époque déjà, les auteurs statuaient sur le fait que la Corse rassemblait tous les éléments nécessaires à une émergence future de bilharziose urogénitale (Doby, Rault, Deblock, & Chabaud, 1966b). Les analyses moléculaires menées sur la souche de schistosome présente en Corse révéleront que cette souche est originaire du Sénégal, probablement introduite en Corse par des voyageurs ou des travailleurs saisonniers (Boissier et al., 2016), mais surtout qu'il s'agit d'une souche hybride entre *S. haematobium* et *S. bovis* (*i.e.* un schistosome infectant bovins, ovins, caprins et autres rongeurs) ce qui ajoute une dimension zoonotique à cette émergence (Mone et al., 2015; Savassi et al., 2020). En conséquence, l'accès à la rivière Cavu deviendra étroitement contrôlé pour être totalement interdit pour la baignade au cours de l'année 2014. Ces mesures temporaires n'empêcheront malheureusement par la déclaration de nouveaux cas de bilharziose urogénitale autochtone survenus pendant les étés

2015 et 2016 suggérant une persistance locale du cycle parasitaire (Berry et al., 2016; Ramalli et al., 2018). En 2017 et 2019, d'autres cas contractés dans la Solenzara, une rivière voisine du Cavu seront identifiés (Noel et al., 2018; données non publiées).

L'émergence de bilharziose en Corse était donc inattendue par rapport à d'autres parasitoses telles que les arboviroses dont les hôtes vecteurs sont des espèces invasives (Gould, Galian, De Lamballerie, & Charrel, 2010; Schaffner et al., 2013) et les autorités de santé publique se sont retrouvées prises au dépourvu face à cette nouvelle crise (Kincaid-Smith et al., 2017). Ces événements ont mené à une reconsidération des méthodes de suivi des bilharzioses et plus généralement des trématodoses quant à leur efficacité pour prévenir de ces événements d'émergences dans le contexte changeant actuel (Mone, Holtfreter, Mouahid, & Richter, 2016; Kincaid-Smith et al., 2017). De même, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer comment un parasite tropical parvenait à compléter son cycle de vie à des latitudes tempérées (Ramalli et al., 2018), une série de questionnements auxquels nous apporterons des éléments de réponse dans le premier chapitre de ce manuscrit.

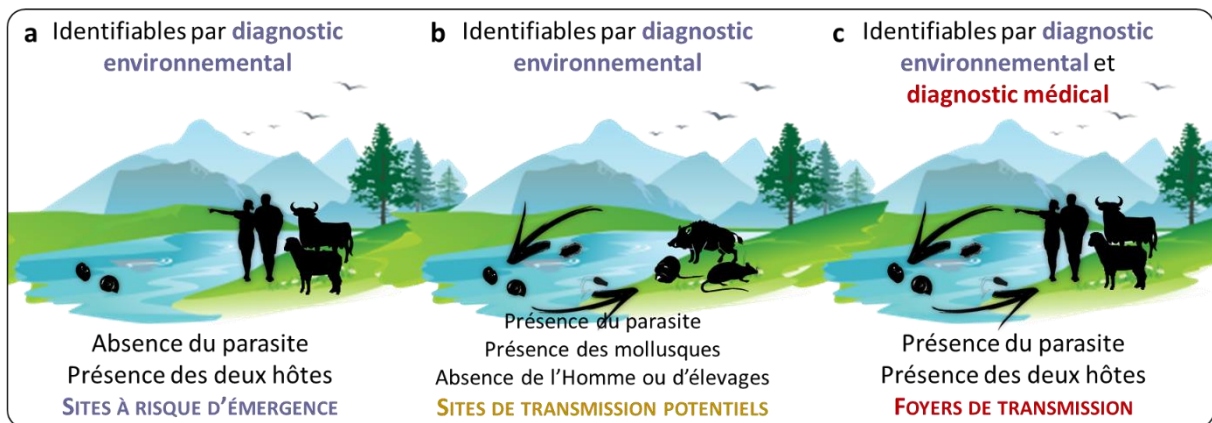
#### **4. Les outils existants pour le suivi des maladies transmises par les mollusques d'eau douce**

##### **a. Le diagnostic médical**

Pour les mêmes raisons que les stratégies de contrôle à l'encontre des bilharzioses se focalisent essentiellement sur les hôtes définitifs (Kincaid Smith, 2018; WHO, 2020), les outils existant pour le suivi de ces maladies reposent essentiellement sur des données épidémiologiques obtenues à partir du diagnostic de patients ou d'animaux d'élevages infectés (Kincaid-Smith et al., 2017; Ajibola, Gulumbe, Eze, & Obishakin, 2018; Beesley et al., 2018). L'abondance de ces données est très hétérogène et dépend largement de l'impact de la maladie étudiée en santé humaine (*e.g.* bilharzioses) ou dans l'industrie de l'élevage (*e.g.* fasciolose) (Kincaid-Smith et al., 2017). Ces méthodes peuvent être subdivisées en deux catégories. Les méthodes directes qui s'appuient sur l'observation directe de parasites sous leur forme adulte ou sous forme d'œufs dans des échantillons de tissus, d'urines ou de fèces (Pontes, Oliveira, Katz, Dias-Neto, & Rabello, 2003; Brockwell, Spithill, Anderson, Grillo, &

Sangster, 2013; Weerakoon, Gobert, Cai, & McManus, 2015). Les méthodes d'observations indirectes qui impliquent la détection d'antigènes du parasite par sérologie (Espinoza et al., 2007; Gomes et al., 2010; Brockwell et al., 2013), ou la détection de son ADN (Sandoval et al., 2006; ten Hove et al., 2008; Gomes, Marques, Enk, Coelho, & Rabello, 2009; Lier et al., 2009; Wichmann et al., 2009; Xu et al., 2010; Weerakoon, Gordon, & McManus, 2018) par des approches moléculaires basées sur la « polymerase chain reaction » ou PCR (Mullis & Faloona, 1987). La PCR étant une succession de réactions de réplication ciblées en trois étapes induites par des variations de température (*i.e.* dénaturation du double brin d'ADN, hybridation des amorces spécifiques à la séquence cible et élongation par polymérisation de la séquence d'ADN cible, qui aboutit à la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à cette séquence ; Mullis and Faloona, 1987), elles visent à amplifier spécifiquement une séquence ADN parmi d'autres.

Les outils diagnostics médicaux existant pour le dépistage de maladies transmises par les mollusques d'eau douce sont multiples et complexes, ils constituent tout un domaine que nous ne traiterons pas en détail dans ce manuscrit. Il est cependant important de retenir que ces méthodes ne permettent pas une anticipation de la transmission du parasite à l'Homme ou au bétail. En effet, ce diagnostic intervient très tardivement dans le cycle parasitaire ce qui ne permet pas d'anticiper un évènement d'émergence. Ces approches sont donc utiles pour une identification des foyers de transmissions actifs (*i.e.* des environnements dans lesquels le parasite se transmet entre des mollusques et des hôtes définitifs humains ou bétail, **Figure 9c**) par opposition aux sites à risque d'émergence (*i.e.* fréquentés par des hôtes définitifs humains ou bétail et dans lesquels sont présents des mollusques compatibles mais pas le parasite, **Figure 9a**), et les sites de transmission potentiels (*i.e.* dans lesquels le parasite effectue son cycle entre des mollusques et des hôtes définitifs de la faune sauvage, **Figure 9b**).



**Figure 9. Schématisation différenciant les foyers de transmission des sites de transmission potentiels et des sites à risque d'émergence.** Alors que les foyers de transmission actifs (c) sont tardivement identifiables par le diagnostic médical, le diagnostic environnemental permet un suivi du parasite avant qu'il n'atteigne l'Homme. Cette approche permet donc d'identifier précocement les sites à risques d'émergence (a) en cas d'introduction du parasite et les sites à risque de transmission (b) si ces derniers sont fréquentés par l'Homme ou par les élevages.

## b. Le diagnostic environnemental

À des fins de prévention, la détection et le suivi de la dynamique du parasite en dehors du compartiment de l'hôte définitif humain ou domestique ainsi que le suivi environnemental de la dynamique des mollusques compatibles, paraissent nécessaires (WHO, 2020). Cependant, les outils permettant ce type de suivi sont rares et très peu d'études se focalisent sur le rôle crucial des mollusques dans le complexe d'interaction entre les mollusques et les parasites de mollusques (Lu et al., 2018). C'est pourquoi, les données sur la distribution des mollusques sont également rares et peu précises à grande échelle (Lu et al., 2018), certaines de ces données datent même de plusieurs siècles (Welter-Schultes, 2012) ceci pour des raisons que nous aborderons en chapitre II. Les outils de diagnostics existant pour la détection de mollusques infectés ou de trématodes dans l'environnement nécessitent encore beaucoup d'améliorations et devraient être plus souvent intégrés dans les stratégies de lutttes à l'encontre des maladies transmises par les mollusques d'eau douce à l'avenir (Lu et al., 2018; Weerakoon et al., 2018; WHO, 2020). Utilisées régulièrement, les approches environnementales peuvent donner des informations sur l'apparition de nouveaux foyers de transmission actifs et sur les zones à risque d'émergences par la mise à jour des données de distributions sur les trématodes et les mollusques (Lu et al., 2018). Cela permet en effet d'établir les prévalences parasitaires dans les populations de mollusques et d'hôtes définitifs

sauvages, ainsi que les variations spatiales et saisonnières de ces prévalences (Hamburger et al., 2004; King, Sturrock, Kariuki, & Hamburger, 2006; Lu et al., 2018).

Comme pour le diagnostic humain, les outils de suivi de ces organismes dans l'environnement sont, pour les plus anciennes, généralement basés sur de l'observation directe de mollusques et de parasites (Lu et al., 2018). Deux approches directes sont alors différenciables. La première consiste à identifier un mollusque ou un hôte définitif non humain naturellement infecté dans l'environnement, généralement par de la prospection malacologique, par de la dissection des tissus ou de l'émission de cercaires, des méthodes encore largement employée pour la bilharziose (Born-Torrijos, Poulin, Raga, & Holzer, 2014; Boissier et al., 2016; Lu et al., 2018). Une alternative consiste à utiliser des mollusques et/ou des rongeurs « sentinelles » mis aux abords des milieux d'eau douce fréquentés par l'Homme, qui sont infectés par le parasite quand ce dernier est présent localement (Emukah et al., 2012; Allan et al., 2013). Le second type d'approches directes concerne la cercariométrie, ou les méthodes visant à observer les formes libres du parasite (*i.e.* miracidia ou cercaires) à partir d'échantillons d'eau filtrés directement sur le terrain (Theron, 1979a, 1986). Quelles que soient les approches par observation directe, elles deviennent rapidement limitantes lors d'une application à large échelle à cause de l'effort d'échantillonnage (Lu et al., 2018), de la main d'œuvre (Kincaid-Smith et al., 2017) et du coût qu'elles requièrent (Holmes, Rambaut, & Andersen, 2018).

C'est pourquoi ces deux dernières décennies de nouvelles approches moléculaires ont été développées et sont de plus en plus utilisées (Lu et al., 2018) et plus particulièrement les outils de diagnostics intramolluscal que nous verrons plus en détail en chapitre II. Ces approches sont basées sur de l'amplification d'ADN de parasites par PCR ou technologies dérivées (Lu et al., 2018). Elles sont reconnues comme étant plus sensibles que les approches traditionnelles (Lu et al., 2018) en permettant de détecter les stades d'infection précoces et les infections avortées dans les mollusques, indécélables par des approches comme l'émission de cercaires (Hanelt, Adema, Mansour, & Loker, 1997; Jannotti-Passos et al., 1997; Hamburger, Xu, Ramzy, Jourdane, & Ruppel, 1998). De fait, les approches moléculaires sont particulièrement adaptées pour des suivis à large échelle des maladies transmises par les mollusques d'eau douce (Melo, Gomes, Barbosa, Werkhauser, & Abath, 2006). Dans les versions les plus récentes, des méthodes basées sur du séquençage d'amplicons ciblés issus

de diagnostics PCR permettent même l'identification simultanée de plusieurs espèces de trématodes ainsi que de l'hôte mollusque par séquençage (Schols et al., 2019 ; Hammoud et al., in prep). Cependant, ces approches moléculaires intramolluscale et intrahôtes définitifs peuvent être limités dans les environnements où les prévalences intramolluscale sont faibles (Eppert et al., 2002) mais aussi à cause du coût que ces approches moléculaires peuvent représenter pour des régions d'endémie comme l'Afrique lors d'application sur un grand nombre d'échantillons (Lu et al., 2018).

### c. L'ADN environnemental

Dans ce contexte, les nouvelles approches moléculaires de détection basées sur l'ADN environnemental sont intéressantes pour des modèles comme les maladies transmises par les mollusques d'eau douce compte tenu de l'importante part du cycle de transmission qui s'effectue en milieux aquatiques, **Figures 7 et 8**, et de la facilité à prélever des échantillons environnementaux (Philip Francis Thomsen & Willerslev, 2015; Taberlet, Bonin, Zinger, & Coissac, 2018). De plus, ces approches sont particulièrement adaptées à la détection d'organismes microscopiques tels que les stades libres de nombreux parasites (Bohmann et al., 2014; Bass, Stentiford, Littlewood, & Hartikainen, 2015).

### Définitions

L'ADN environnemental (ADNe) peut se définir par « Un mélange complexe d'ADN génomique provenant de nombreux organismes différents trouvés dans un échantillon environnemental » selon la première définition proposée par (Taberlet, Coissac, Hajibabaei, & Rieseberg, 2012). Cette approche présente donc l'avantage de pouvoir identifier des organismes sans avoir à les isoler ou à les observer au préalable (Taberlet et al., 2012). L'échantillon environnemental peut désigner de l'eau, des sédiments, de l'air, des fluides biologiques (*e.g.* urine, fèces, sang), mais aussi le matériel utilisé pour la filtration d'échantillons environnementaux tels que des membranes filtrantes (Taberlet et al., 2018). De fait, ce type d'approche peut également être appliqué aux maladies transmises par les mollusques impliquant des mollusques terrestres dans leur cycle, **Figure 7**. Quand l'ADNe désigne l'objectif de l'étude, ce dernier peut se définir par « l'ADN qui peut être extrait à partir

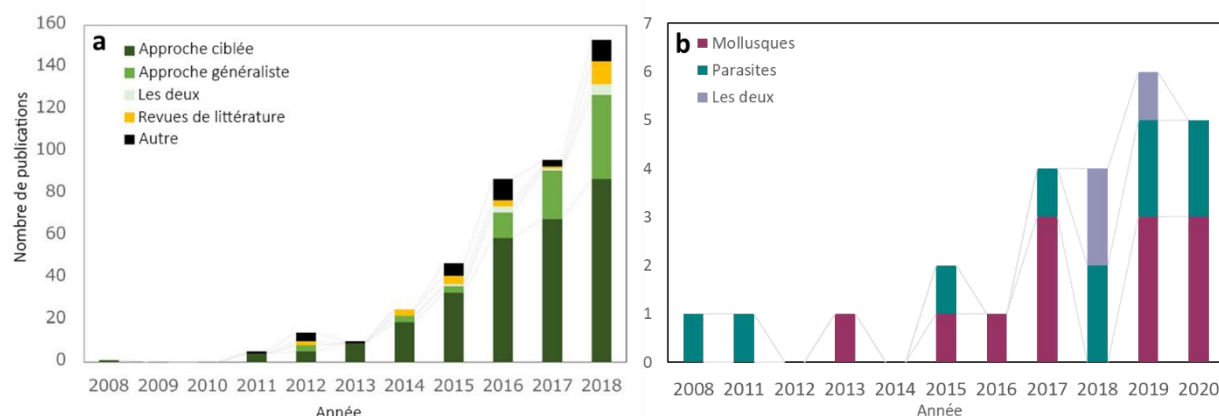
d'échantillons environnementaux dans l'objectif d'obtenir des informations taxonomiques ou fonctionnelles plus complètes à partir d'ADN retrouvé dans l'écosystème étudié » (Taberlet et al., 2018). Cet ADN peut provenir de cellules vivantes ou d'ADN extracellulaire résultat de la destruction naturelle de la structure de cellules mortes par des procédés physiques, chimiques ou biologiques (Shapiro, 2008; Taberlet et al., 2018). En effet, l'ADNe va subir au fil du temps une dégradation et une fragmentation par l'action de l'eau, de processus physico-chimiques, du pH et par l'activité des autres organismes (Shapiro, 2008; Strickler, Fremier, & Goldberg, 2015; Seymour et al., 2018; Taberlet et al., 2018; van Bochove et al., 2020), de plus l'ADN libre peut être absorbé par des particules organiques ou inorganiques ayant une affinité avec l'ADN tel que le sable, l'argile, le limon et l'humus (Taberlet et al., 2018). De fait, la persistance de l'ADN dans l'environnement va grandement dépendre du type d'environnement dans lequel il se trouve, de quelques heures à 1 mois dans la colonne d'eau (Dejean et al., 2011), environs 130 jours à des milliers d'années dans la terre et les sédiments (Haile et al., 2007; Turner, Uy, & Everhart, 2015), et jusqu'à plusieurs centaines de milliers d'années dans des substrats spécifiques tels que du permafrost ou des noyaux de glace profonde (Willerslev et al., 2007; Pedersen et al., 2015), ces estimations dépendent des conditions physicochimiques et biologiques de l'environnement d'origine.

### Historique

Le terme « d'ADN environnemental » émerge pour la première fois dans la littérature scientifique en 1987, dans des études de microbiologie visant à identifier l'ADN d'organismes microbiens spécifiques à partir de sédiments (Ogram G.S, 1987). Quelques années plus tard, en 1990, une équipe publiera la première étude généraliste visant à analyser la diversité génétique de bactérioplanctons à partir d'ARN ribosomique par des approches de metabarcoding sur des échantillons d'eau de mer (Giovannoni, Britschgi, Moyer, & Field, 1990; Taberlet et al., 2018). En 1998, ce sera la première étude de métagénomique qui paraîtra dans la littérature scientifique, une étude visant à identifier des voies de synthèse de molécules bioactives chez des microorganismes à partir d'ADNe contenus dans les sols (Handelsman, Rondon, Brady, Clardy, & Goodman, 1998). Après toutes ces avancées en microbiologie, les années 2000, connaîtront un essor important de l'utilisation de l'ADNe en microbiologie, car cette approche permet d'avoir accès au génome d'organismes non cultivables *in vitro* ou celui

d'espèces rares ou cryptiques (Taberlet et al., 2018). Avec les nouvelles technologies de séquençage, il est même possible d'assembler de larges génomes provenant de ces organismes difficilement observables et cultivables (Taberlet et al., 2012; Taberlet et al., 2018). Les années qui suivent, l'ADNe sera appliqué pour la première fois dans d'autres domaines, notamment en 2003 pour la reconstruction de communautés anciennes à partir d'ADNe piégé dans le permafrost (Willerslev et al., 2003), ce sera également la première application de l'approche ADNe pour la détection de macroorganismes (Taberlet et al., 2018). En ce qui concerne les milieux d'eau douce qui nous intéressent, la première application de ces approches dans ce type de milieux sera en 2008, pour la détection de la grenouille *Rana catesbeiana* à partir d'échantillons d'eau (Ficetola, Miaud, Pompanon, & Taberlet, 2008), ce sera cette même année que l'outil sera appliqué pour la première fois à un trématode, *Trichobilharzia* sp., dont les cercaires sont détectées par PCR à partir d'échantillons d'eau filtrée (Schets, Lodder, van Duynhoven, & de Roda Husman, 2008). Puis en 2009 et 2010, l'ADNe sera appliqué pour la première fois pour l'analyse de régimes alimentaires à partir de fèces en utilisant les nouvelles générations de séquenceurs (Valentini, Pompanon, & Taberlet, 2009; Deagle, Jarman, Coissac, Pompanon, & Taberlet, 2014; Taberlet et al., 2018). Enfin à partir de 2012, et avec l'accessibilité grandissantes aux nouvelles technologies de séquençages et aux plateformes de séquençages (Taylor & Harris, 2012; Taberlet et al., 2018), l'utilisation de l'ADNe en sciences de l'environnement se démocratisera et les publications employant ce type d'approche paraîtront plus régulièrement (Taberlet et al., 2018), notamment pour la détection de macroorganismes, passant de 10 publications en 2012 à plus de 150 en 2018, **Figure 10a** (Tsuji, Takahara, Doi, Shibata, & Yamanaka, 2019). En ce qui concerne les trématodes et les mollusques d'eau douce, ce sera à partir de 2015 que l'ADNe connaîtra un essor important, **Figure 10b**.





**Figure 10. Nombres de publications sur la détection de macroorganismes par ADN environnemental parues entre 2008 et 2018-20.** (a) Publications portant sur la détection de macroorganismes par ADNe, en incluant pour 2018 les publications publiées et en cours de publication à la date du 31 décembre 2018. La catégorie « autre » inclut divers types de documents (e.g. actualités, introductions, opinions et perspectives). (b) Publications portant sur la détection de trématodes ou de mollusques d’eau douce, en incluant en 2020 les articles publiés à la date du 31 mai 2020 et les articles en préimpression. (Modifié de : Tsuji et al., 2019)

### Les différentes approches basées sur l’ADNe

Les approches exploitant l’ADNe peuvent être subdivisées en deux grandes catégories (Taberlet et al., 2018). Tout d’abord les approches ciblées dont l’objectif est de déterminer la présence/absence d’une espèce spécifique dans un environnement ou « single-species detection » (SSD) (Seymour, 2019). Ces approches SSD sont généralement basées sur des technologies d’amplification d’ADN dérivées de la PCR : (i) la PCR quantitative (qPCR) similaire à la PCR classique (Logan, Logan, Edwards, & Saunders, 2009), mais dont la mesure du signal d’amplification se fait à chaque cycle d’amplification ; (ii) la PCR digitale (ddPCR) (Doi et al., 2015), réputée plus sensible que la qPCR étant donné que l’échantillon amplifié est subdivisé en microgouttelettes dans chacune desquelles a lieu une réaction d’amplification individuellement quantifiées (Hindson et al., 2011) ; et (iii) la LAMP PCR pour « Loop-mediated isothermal amplification » ou amplification isotherme médiée par les boucles (Notomi et al., 2000), plus spécifique et ne nécessitant pas de cycles de températures (Williams et al., 2017). Toutes ces approches permettent théoriquement d’obtenir des données quantitatives, notamment une estimation de l’abondance d’une espèce dans un environnement donné, elles sont donc particulièrement employées en parasitologie à des fins de diagnostic (Bass et al., 2015).

Le second type d'approches est plus généraliste, et vise à identifier un ensemble d'espèces au sein d'un même groupe taxonomique ou clade (Taberlet et al., 2018), nous parlons alors de « multi-species detection » (MSD) (Seymour, 2019) et plus généralement de metabarcoding d'ADN ou de metabarcoding environnemental (Riaz et al., 2011; Taberlet et al., 2018). Le barcode, ou code barre en français, faisant l'analogie entre une courte séquence d'ADN conservée et représentative d'un taxon qui est utilisée comme amorce pour la PCR et le code barre unique servant à identifier un article parmi d'autres. Ainsi, le metabarcoding environnemental décrit l'identification simultanée de plusieurs taxa présents au sein d'un même échantillon environnemental (Riaz et al., 2011; Taberlet et al., 2018). Ce type d'approche bien que basée sur de la PCR, s'appuie sur des technologies de séquençage nouvelle génération (NGS) (Deiner et al., 2017) ou sur du séquençage « en vrac » ou shotgun (Deininger, 1983; Taberlet et al., 2018). Ces approches généralistes sont particulièrement utiles pour caractériser la composition en espèces de groupes taxonomiques tout entiers au sein d'un même environnement simplement à partir d'échantillons environnementaux et sans nécessiter l'échantillonnage manuel de toutes ces espèces (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2018).

Ces deux types d'approches seront présentés en détail dans les deux chapitres qui leur sont dédiés, à savoir le chapitre II pour les approches ciblées et le chapitre III pour les approches de metabarcoding environnemental. Ceci afin de mieux décrire ces approches, leurs contextes d'applications ainsi que leurs avantages et inconvénients respectifs, à travers des cas d'application concrets.

## 5. Objectifs et problématique de la thèse

Avec l'accélération des changements globaux et la recrudescence des cas d'émergences et de réémergences de maladies infectieuses transmises par les mollusques d'eau douce dans le monde, il devient capital de comprendre comment ces perturbations environnementales agissent sur la dynamique de transmission de ces parasites. C'est pourquoi, les outils de suivis utilisés et les actions menées à l'encontre de ces maladies nécessitent des approches plus intégratives que le diagnostic et le traitement des hôtes

définitifs. Il est désormais nécessaire de s'intéresser à la dynamique de ces parasites dans l'environnement et dans leurs hôtes mollusques pour prévenir de ces émergences. Dans cette thèse, nous proposons donc de (i) combiner des approches d'expérimentations en laboratoire et en milieux naturels pour comprendre ces événements d'émergences en intégrant le rôle de l'environnement et de tous les acteurs impliqués dans le cycle parasitaire autre que l'Homme (*i.e.* trématodes, hôtes mollusques, hôtes définitifs sauvages et domestiques) ; (ii) développer de nouveaux outils de suivis par détection d'ADNe pour améliorer notre capacité à identifier les foyers de transmission **Figure 9c**, les sites de transmission potentiels **Figure 9b** et les sites à risque d'émergences **Figure 9a**, pour contrôler ces maladies et prévenir de leur émergence ; (iii) caractériser les communautés de mollusques et de trématodes pour étudier les interactions biotiques entre ces organismes à des fins de lutte biologique ; et (iv) mener une réflexion générale sur l'intégration et l'amélioration de ces divers outils et connaissances dans de nouvelles stratégies de lutttes à l'encontre des maladies transmises par les mollusques d'eau douce.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous nous intéresserons au processus d'émergence d'une maladie infectieuse, **Chapitre I.1**. Avec l'exemple de l'émergence de bilharziose en Corse, nous tenterons de comprendre comment un parasite tropical a pu émerger et établir son cycle à des latitudes européennes. Pour ce faire nous étudierons les traits d'histoire de vie de *S. haematobium* en particulier sa thermo tolérance, en évaluant la capacité de ce parasite à survivre tout un hiver européen dans son hôte mollusque, **Chapitre I.1.a**. Nous évaluerons également le rôle de l'hôte mollusque *B. truncatus* dans le maintien local de ce parasite en soumettant des mollusques infectés au même hiver artificiel que pour le parasite, **Chapitre I.1.b**. Toujours dans l'idée d'expliquer la persistance de ce cycle parasitaire et compte tenu du statut hybride de la souche de *S. haematobium* isolée en Corse, nous évaluerons le potentiel rôle des hôtes définitifs domestiques (*i.e.* ruminants) et sauvages (*i.e.* rats) dans cette persistance en combinant une enquête séro-épidémiologique sur les élevages de Corse et une campagne de piégeages de rongeurs, **Chapitre I.1.c**.

Dans le second chapitre, nous présenterons les limites des outils de diagnostics actuels pour faire un suivi à large échelle des hôtes mollusques et de trématodes dans l'environnement, **Chapitre II**. Nous présenterons alors le développement de nouveaux outils de diagnostics basés sur la détection d'ADNe de ces organismes dans l'eau. Nous verrons

premièrement le développement et l'application *in natura* d'un outil dédié à la détection d'hôtes mollusques dans l'environnement, en particulier *B. truncatus*, afin d'identifier des sites à risque d'émergence de bilharziose urogénitale, **Chapitre II.1**. Dans un second temps, nous ferons de même pour la détection d'ADN de trématodes dans leurs hôtes mollusques, en particulier *S. haematobium*, afin d'identifier les foyers de transmission actifs de bilharziose urogénitale et d'autres trématodoses, **Chapitre II.2**.

Dans le dernier chapitre, nous présenterons dans un premier temps le développement et l'application en milieu naturel d'un outil de metabarcoding environnemental pour la caractérisation des communautés de mollusques à partir de prélèvements d'eau, **Chapitre III.1**. Et dans un second temps, l'initiation du développement d'un outil similaire dédié à la caractérisation des communautés de trématodes à partir de prélèvements d'eau, **Chapitre III.2**. Ces outils couplés à d'autres outils de metabarcoding environnemental nous permettront à l'avenir d'étudier les interactions biotiques entre les mollusques, les trématodes et les autres organismes présents au sein d'un même écosystème. En effet, ces interactions peuvent limiter la capacité d'un parasite à disperser dans un environnement donné et donc alimenter des stratégies de lutte biologique à l'encontre de ces maladies d'eau douce. Ce qui souligne l'intérêt de caractériser les communautés d'organismes par des approches comme le metabarcoding environnemental, **Chapitre III**.

**Les objectifs en bref :**

- I. **Comprendre l'émergence** et la **persistance** de la bilharziose urogénitale en Corse par une investigation du côté des **traits d'histoire de vie du parasite** et du **rôle de l'hôte mollusque** et des **hôtes définitifs sauvages et domestiques** dans ce maintien local du cycle.
- II. Proposer de **nouveaux outils de diagnostics ciblés** basés sur l'**ADN environnemental** pour le **suivi intramolluscal des trématodes** afin d'identifier les **foyers de transmission** et les **sites à risques de transmission**, puis faire de même pour le **suivi des mollusques** dans l'environnement afin d'identifier les **sites à risques d'émergences**.
- III. **Développer des outils de metabarcoding environnemental** pour **caractériser** les **communautés de mollusques** et les **communautés de trématodes** pour faciliter la caractérisation et l'intégration des **interactions** entre ces espèces à des stratégies de **lutte biologique**.

Enfin, nous discuterons de l'association de tous ces éléments pour les intégrer aux stratégies de contrôle des maladies transmises par les mollusques d'eau douce.

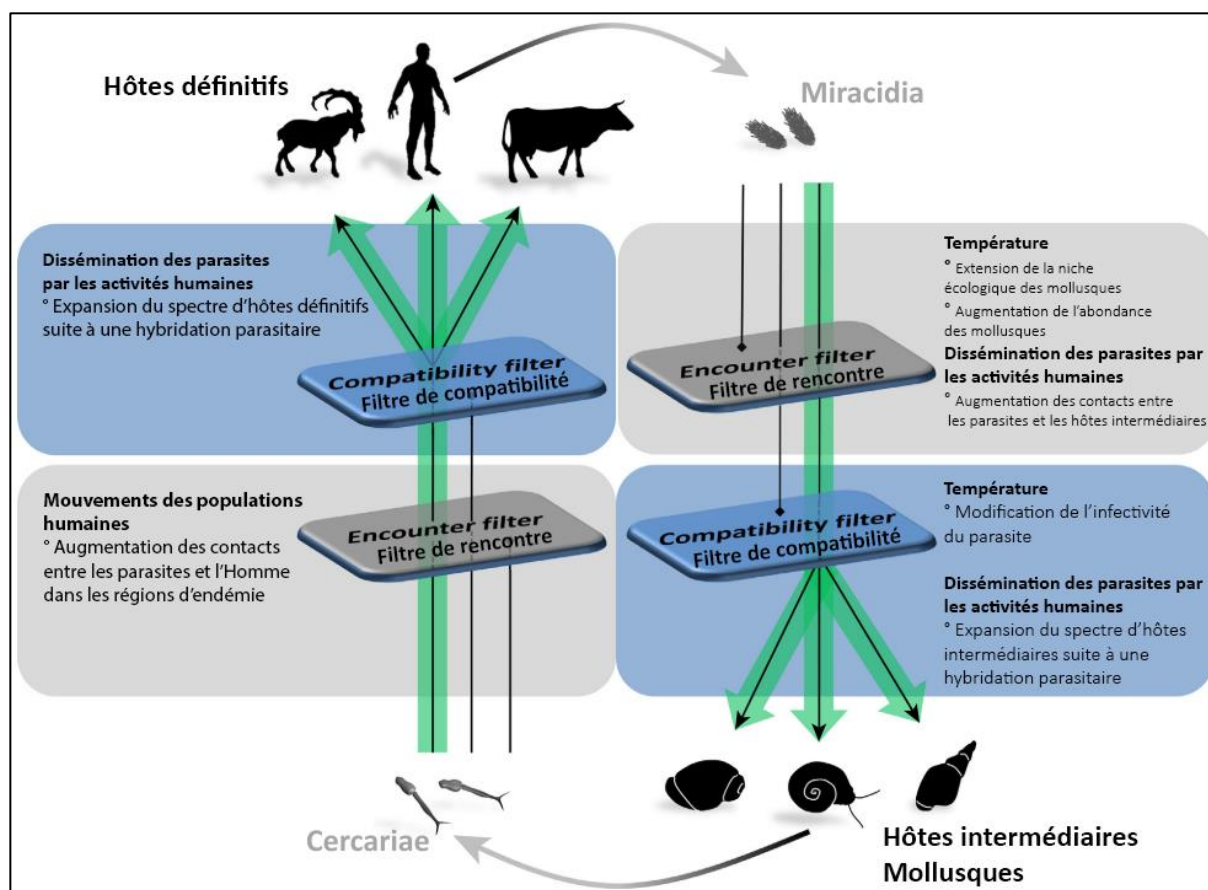
## CHAPITRE I : Facteurs d'émergences de maladies infectieuses, le cas de la bilharziose

---

### 1. Le processus d'émergences de maladies infectieuses

L'émergence d'une maladie infectieuse est un processus divisible en plusieurs étapes (Morse, 1995; Morse et al., 2012) notamment mises en évidence pour les maladies zoonotiques qui représentent plus de 60% des cas d'émergences ou ré(émergences) de maladies infectieuses (Jones et al., 2008). Quel que soit le modèle, deux étapes clés sont généralement évoquées, la première est l'introduction du parasite dans un nouvel environnement (*i.e.* la pré-émergence ; Morse et al., 2012). La seconde correspond à l'établissement permanent et la dissémination du parasite (*i.e.* l'endémisation ; Morse, 1995), et décrit le moment où le parasite parvient à compléter son cycle dans la zone d'invasion. Par la suite cette schématisation a été complétée par l'ajout d'une troisième étape, qui décrit la dynamique d'un parasite parfaitement adapté à l'Homme dont la dispersion dans les populations humaines a grandement augmenté pour évoluer vers une pandémie (Morse et al., 2012). Cette dispersion est généralement assuré par le biais d'activités humaines telles que les flux aériens et plus généralement les échanges internationaux (Morse et al., 2012) ; un phénomène que nous avons pu observer en temps réel pour la pandémie de COVID-19 entre 2019 et 2020 (Chatterjee et al., 2020).

L'établissement permanent d'un cycle parasitaire repose sur plusieurs éléments inhérents aux interactions hôtes/parasites nécessaires, qui ont été conceptualisés sous la forme de filtres dans les années 2000 (Euzet & Combes, 1980; Combes, 2001). En effet, le parasite doit pouvoir entrer en contact avec des hôtes définitifs et lorsque nécessaire avec des hôtes intermédiaires dans l'environnement d'accueil, ce qui constitue un filtre de rencontre, **Figure 11** (Kincaid-Smith et al., 2017). Ensuite le parasite se confronte au filtre de compatibilité : les hôtes du parasite doivent être compatibles permettant ainsi au parasite d'atteindre le stade suivant de son développement, **Figure 11** (Kincaid-Smith et al., 2017).



**Figure 11. Émergences de bilharzioses en Europe : Comment les changements globaux peuvent élargir les filtres de rencontre et de compatibilité.** Chacun des deux stades larvaires libres des schistosomes est sujet aux filtres de rencontre et de compatibilité. La rencontre de ces larves avec les hôtes intermédiaires et définitifs dépend d’une ouverture du filtre de rencontre (*i.e.* présence simultanée dans l’espace et le temps des hôtes et des parasites). Vient ensuite le filtre de compatibilité (*i.e.* l’hôte doit fournir les ressources adéquates au développement du parasite tout en étant incapable de l’éliminer). Les changements climatiques ou anthropiques peuvent provoquer une ouverture simultanée de ces deux filtres, facilitant ainsi l’établissement d’un parasite dans des régions non endémiques. (Source : Kincaid-Smith et al., 2017)

Outre la disponibilité en hôtes compatibles, l’environnement d’accueil joue également un rôle régulateur. En effet, ce dernier va induire des pressions de sélection, qu’elles soient biotiques ou abiotiques, sur les systèmes hôtes/parasites qui l’habitent (Fabian & Flatt, 2012). En somme, l’environnement d’accueil influence les traits d’histoire de vie des organismes qui le composent (Fox & Messina, 2013). Les traits d’histoire de vie peuvent être définis par l’ensemble des événements majeurs au cours de la vie d’un individu qui contribuent directement à sa survie et à celle de ces descendants (Fox & Messina, 2013). La pression de sélection induite par l’environnement va sélectionner l’expression de phénotypes en réponse aux stress environnementaux (Fabian & Flatt, 2012), et potentiellement mené à un

phénomène d'adaptation (Gould & Vrba, 1982). Lorsqu'un organisme comme un parasite est introduit dans un nouvel environnement, les pressions de sélection exercées sur l'organisme nouvellement introduit peuvent être importantes, car très différentes de son habitat d'origine. C'est pourquoi les espèces capables de s'établir dans une grande diversité d'environnements présentent généralement une plus grande plasticité phénotypique que les autres espèces (*i.e.* une plus grande capacité à s'adapter rapidement aux pressions induites par leurs environnements ; Davidson, Jennions, and Nicotra, 2011; Mideo and Reece, 2012). Cela concerne particulièrement les parasites qui vivent obligatoirement dans leurs hôtes, un environnement changeant dans le temps et relativement hostile en fonction des réactions immunitaires déployées à l'encontre du parasite (Mideo & Reece, 2012).

Dans un contexte d'émergence, la préadaptation et/ou l'exaptation (Gould & Vrba, 1982; Ridley, 2009) peuvent également influencer sur la capacité d'un parasite à émerger dans une nouvelle localité (Kincaid-Smith et al., 2017). La préadaptation en évolution correspond à « des caractéristiques qui confère une plus grande aptitude, c'est-à-dire une capacité d'adaptation, dans un nouvel habitat » (Hufbauer et al., 2012). Deux processus se distinguent dans les phénomènes de préadaptation. (i) L'exaptation qui décrit aussi bien des caractéristiques anatomiques que comportementales, initialement sélectionnées pour assurer une fonction précise chez un organisme dans un environnement, mais qui se retrouvent conservée dans la descendance pour assurer une autre fonction dans de nouveaux environnements (Gould & Vrba, 1982; Ridley, 2009; Hufbauer et al., 2012; Ardila, 2016). Elle se produit lorsqu'un trait qui a évolué sous un régime de sélection est coopté par hasard pour assurer une nouvelle fonction (Hufbauer et al., 2012). L'un des exemples le plus connu étant la plume des oiseaux dont l'objectif évolutif initial était l'isolation thermique, mais qui a permis par la suite une adaptation de ces organismes au vol (Ardila, 2016). (ii) L'adaptation préalable, qui décrit le cas où l'adaptation à une ou plusieurs caractéristiques de l'environnement d'origine facilite l'invasion d'environnements similaires, sans changement de fonction contrairement à l'exaptation (Hufbauer et al., 2012). Cependant le terme préadaptation reste le plus employé dans la littérature à l'heure actuelle (Ardila, 2016). Des phénomènes d'exaptation ont déjà été identifiés comme jouant un rôle clé dans les interactions hôtes/parasites. C'est le cas de *Polymorphus minutus*, un parasite acanthocéphale d'oiseaux qui, pour se transmettre à son hôte définitif, altère le comportement de son hôte



intermédiaire *Gammarus roeseli* pour qu'il se fasse ingérer par un hôte définitif (Beisel & Médoc, 2010). Dans cette étude, il a été démontré que cette capacité à altérer le comportement de l'hôte intermédiaire afin que ce dernier nage en surface pour être plus facilement ingéré par un hôte définitif (Bauer, Haine, Perrot-Minnot, & Rigaud, 2005), serait en fait une modification comportementale stimulée par la présence de prédateurs benthiques non compatibles avec le parasite (Beisel & Médoc, 2010). Ces phénomènes de préadaptation ou exaptation et de plasticité phénotypique constituent donc un élément clé lors d'un processus d'émergence en particulier pour l'établissement d'une maladie, et doivent être connus pour correctement évaluer le risque représenté par une maladie infectieuse émergente (Kincaid-Smith et al., 2017).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'étudier un cas récent d'émergence en phase d'endémisation. Il s'agit de l'émergence de bilharziose urogénitale en Corse du Sud-Est (Berry et al., 2014; Holtfreter et al., 2014; Boissier, Kincaid-Smith, et al., 2015; Berry et al., 2016; Boissier et al., 2016). À la suite de l'épidémie initiale de 2013, et avec la détection de nouveaux cas humains autochtones les années qui suivirent (Berry et al., 2016; Boissier et al., 2016; Noel et al., 2018; Ramalli et al., 2018), plusieurs hypothèses non exclusives ont été proposées pour expliquer la persistance de ce parasite tropical à de telles latitudes :

- Le parasite est annuellement réintroduit dans la rivière par des personnes infectées provenant de zones d'endémie de bilharziose, ou ayant acquis le parasite localement les années passées (Noel et al., 2018).
- Le parasite survit dans ses hôtes intermédiaires mollusques pendant l'hiver et infecte des hôtes définitifs l'été suivant (Ramalli et al., 2018).
- Le parasite, étant une souche hybride entre une espèce de schistosome infectant l'Homme (*i.e. S. haematobium*) et une espèce de schistosome infectant le bétail et d'autres vertébrés sauvages tels que les rongeurs (*i.e. S. bovis*), parvient à se maintenir dans des hôtes réservoirs, domestiques ou sauvages, vivant à proximité des rivières (Ramalli et al., 2018).

Bien que la première hypothèse de réensemencement annuel des rivières par des personnes infectées demeure la plus soutenue (Ramalli et al., 2018), nous avons testé l'hypothèse que d'une part les mollusques, de l'autre les hôtes définitifs des faunes sauvage et domestique jouent un rôle dans le maintien du cycle de vie du parasite dans les rivières de

Corse sans l'intervention de l'Homme. Ces deux hypothèses ont été évaluées au travers des deux études qui constituent ce premier chapitre de thèse.

- **Publication 1 : Mulero, S. ; Rey, O ; Arancibia, N. ; Mas-Coma, S. ; Boissier, J. (2019).** Persistent establishment of a tropical disease in Europe: the preadaptation of schistosomes to overwinter. *Parasites & Vectors*, 12(1): 379. Doi: 10.1186/s13071-019-3635-0

Dans cette première étude, nous nous sommes proposés de comparer la capacité de la souche hybride de schistosome établie en Corse et celle de plusieurs lignées de *S. haematobium* tropicales à survivre aux températures hivernales classiquement retrouvées en Corse quand elles infectent la souche locale de *B. truncatus*. Notre objectif était de déterminer si des phénomènes de préadaptation de ces parasites aux climats tempérés pouvaient expliquer la persistance du cycle parasitaire en Corse. Nous avons ensuite évalué la capacité de ces souches de parasites à reprendre leur cycle de vie post-hivernage après un retour à des températures estivales classiques. Par la même occasion nous avons évalué la capacité de souches de mollusques d'origine tropicales et tempérées, saines et infectées, à survivre à de telles températures, car la survie du mollusque tout un hiver est un prérequis à la survie du parasite sous l'hypothèse de la survie intramolluscale du parasite.

Pour ce faire, nous avons simulé en milieu contrôlé (*i.e.* mésocosme), un hiver écologiquement réaliste sur plusieurs combinaisons de souches de parasites et de mollusques. Les gradients de température appliqués ont été calibrés à partir de mesures de températures réalisées au cours d'une année entière dans les eaux de la rivière Cavu, le site d'émergence en Corse, ainsi qu'à partir de mesures de températures d'eaux réalisées en hiver dans d'autres rivières Européennes et dans des rivières des zones d'endémie de bilharziose en Afrique. Au total quatre traitements de températures (*i.e.* 4°C, 8°C, 16°C et 24°C) ont été appliqués sur les lots de mollusques sains et de mollusques infectés. À l'exception des mollusques laissés à température ambiante à 24°C, ces traitements consistaient en une diminution progressive de la température jusqu'à atteindre la température minimale du traitement. La température minimale a été conservée sur quelques semaines avant une remontée progressive de la température pour retourner à 24°C. Cet hiver artificiel a été effectué sur 25 semaines afin

d'imiter au mieux la durée de la saison hivernale en milieux naturels. Nous avons testé deux souches de parasites *S. haematobium-bovis* (la souche hybride isolée en Corse) et *S. haematobium* isolé au Cameroun, sur deux souches de mollusques *B. truncatus* de Corse et *B. truncatus* d'Espagne. Nous avons également évalué la capacité de mollusques sains à survivre à ces températures pour trois souches de *B. truncatus* originaires de Corse, d'Espagne et du Cameroun.

#### a. La préadaptation ou exaptation du schistosome aux milieux tempérés

Pour évaluer la capacité de la bilharziose urogénitale à s'installer dans le sud de l'Europe, la première étape a été de déterminer si le parasite, *S. haematobium* est capable de survivre aux températures hivernales classiquement retrouvées à ces latitudes. En effet, la température est connue pour être un des facteurs les plus limitants dans la distribution spatiale d'un organisme et de sa dispersion (El-Hassan, 1974). Dans cette première étude nous avons pu démontrer que toutes les souches de *S. haematobium* testée (*i.e.* la souche isolée en Corse et une souche pure originaire du Cameroun) sont capables de survivre à un hiver européen lorsqu'elles infectent une souche européenne de *B. truncatus* (Corse, Espagne), même à des températures avoisinant les 8°C, ces températures diffèrent grandement des températures d'eau retrouvées dans les zones d'endémie de bilharziose urogénitale (*i.e.* environ 29°C ; Trewavas, Green, and Corbet, 1972; Campbell et al., 2017). De plus, toutes ces souches de parasites ont pu reprendre leur cycle de vie et produire des cercaires viables (*i.e.* capable d'infecter des hôtes définitifs et d'atteindre le stade adulte) après une exposition au froid d'au moins 14 semaines. Cette résistance au froid, se traduisant par un arrêt temporaire du développement parasitaire intramolluscal ou diapause, a été détectée pour toutes les souches de schistosomes testées. À l'inverse, des études testant l'effet des hautes températures sur *S. haematobium*, ont démontré que le parasite pouvait également survivre à des températures proches de 32°C, et que cela se traduisait par une accélération du développement parasitaire intramolluscal, entraînant une forte mortalité chez l'hôte mollusque dont les défenses immunitaires sont affaiblies par les fortes températures (Pflüger, Roushdy, & el-Emam, 1984; Kalinda, Chimbari, & Mukaratirwa, 2017). Dans ce cas, le parasite parvient à survivre à des températures largement au-dessus des températures dites optimales (*i.e.* 25°C ; McCreesh and Booth, 2014). Ces résultats corroborent donc l'hypothèse que les

schistosomes sont préadaptés ou ont une grande plasticité phénotypique au moins en réponse aux variations de température, et comme pour beaucoup de parasites, les schistosomes possèdent une niche thermique étendue permettant de tolérer une large gamme d'environnements différents (Mideo & Reece, 2012).

### **b. Le rôle des mollusques hôtes intermédiaires dans le processus d'émergence**

Dans le contexte d'émergence de la bilharziose en Europe, nos résultats indiquent que *S. haematobium* est tout à fait capable d'effectuer son cycle dans le sud de l'Europe et plus généralement de survivre à des températures allant de 8°C à 32°C, pour reprendre son cycle après un retour à des températures optimales. En conséquence, le parasite serait même capable de tolérer des températures d'eau hivernales caractéristiques des rivières du centre et du nord de l'Europe (*i.e.* 4°C) du moment qu'un mollusque hôte compatible y soit établi. La suite logique à ce raisonnement a donc été d'évaluer s'il en était de même pour le mollusque hôte intermédiaire, *B. truncatus*, et de déterminer si ce dernier pouvait limiter la dispersion du schistosome en Europe.

Les résultats de cette première étude ont démontré que le mollusque *B. truncatus* est résistant à une longue exposition au froid. Contrairement aux parasites, l'intensité de cette résistance dépend de l'origine géographique du mollusque. En particulier, les souches saines de mollusques originaires des régions tempérées (*i.e.* Corse et Espagne) présentaient les taux de survie les plus élevés que la souche tropicale saine, au moins 50% des individus ont survécu à un maintien à 4°C sur 14 semaines. La survie était d'au moins 80% pour les trois autres conditions (*i.e.* 8°C, 16°C et 24°C). La souche camerounaise de *B. truncatus* n'a pas survécu à une exposition prolongée à 4 et 8°C, cependant ces mollusques sont tout de même capables de survivre à une exposition à 16°C pendant 16 semaines, des températures bien plus basses que celles retrouvées dans leur habitat natif (*i.e.* 29°C ; Campbell et al., 2017). Ces différences en matière de résistance à la température entre la souche d'origine tropicale de *B. truncatus* et les souches d'origines tempérées suggèrent une adaptation locale de ces mollusques au climat de leurs latitudes respectives.

Concernant les mollusques parasités, ces derniers ont généralement montré un bien meilleur taux de survie aux températures relativement faible (*i.e.* au moins 80% à 8°C et 16°C) que les mollusques infectés laissés à 24°C ( $\leq 20\%$ ). En somme, les mollusques infectés exposés au froid présentaient des taux de survies très similaires aux mollusques sains pour ces mêmes conditions. Cela pourrait s'expliquer par le ralentissement du développement intramolluscal du parasite en réponse au stress thermique réduisant ainsi l'impact de ce développement parasitaire sur la santé de l'hôte mollusque (Mulero, Rey, Arancibia, Mas-Coma, & Boissier, 2019). Ce résultat indique également qu'un bulin adapté aux températures hivernales locales et un parasite associé peuvent théoriquement survivre tout un hiver dans la rivière, quelle que soit l'origine géographique du parasite. Ainsi, l'expansion et la capacité de la bilharziose urogénitale à s'installer en Europe seraient principalement limitées par le potentiel adaptatif de *B. truncatus* aux faibles températures et de sa capacité à disperser dans de nouveaux environnements. De fait, avec l'élévation globale des températures prévues dans les années futures, la bilharziose urogénitale constitue une nouvelle menace pour le continent européen (Boissier, Kincaid-Smith, et al., 2015).

RESEARCH

Open Access



# Persistent establishment of a tropical disease in Europe: the preadaptation of schistosomes to overwinter

Stephen Mulero<sup>1</sup>, Olivier Rey<sup>1</sup>, Nathalie Arancibia<sup>1</sup>, Santiago Mas-Coma<sup>2</sup> and Jérôme Boissier<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Global changes promote the spread of infectious diseases worldwide. In this context, tropical urogenital schistosomiasis is now permanently established in Corsica since its first emergence in 2013. The local persistence of the tropical pathogens (schistosomes) responsible for urogenital schistosomiasis at such latitudes might be explained by (i) the presence of its intermediate host, the snail *Bulinus truncatus*, (ii) the recurrent local reseeding of schistosomes by their vertebrate hosts (either human or animal) every summer, and/or (iii) the maintenance and survival of schistosomes within their snail hosts over winter.

**Methods:** In this study we conducted an ecological experiment to assess the ability of temperate and tropical schistosome strains to survive in classical winter temperatures in Corsican rivers when infecting temperate (local) snail strains. We also quantified the ability of the schistosomes to complete their life-cycle post-overwintering when returned to classical summer water temperatures.

**Results:** Our results show that Mediterranean molluscs are locally adapted to winter conditions compared to tropical molluscs. Moreover, temperate and tropical schistosome strains equally survived the cold and produced viable offspring when returned to optimal temperatures. These results indicate that schistosomes can overwinter under temperate climates when infecting locally adapted snails and might partly explain the establishment and maintenance of schistosomes in Corsica from year to year.

**Conclusions:** The observed broader thermal range of schistosomes compared to that of their snail hosts was unexpected and clearly indicates that the spread and establishment of schistosomiasis in temperate countries relies primarily on the presence of the locally adapted snail host lineages, currently known to be present in France, Italy, Portugal, Spain and Greece.

**Keywords:** Schistosomiasis, *Bulinus truncatus*, Corsica, Persistence, *Schistosoma haematobium*, Temperature

## Background

There is an increasing interest in the effects of global changes on the emergence and spread of infectious diseases worldwide. Both environmental and anthropogenic changes are expected to promote the geographical spread of pathogens. In particular, tropical infectious diseases are expected to migrate towards more temperate regions [1]. Empirical cases of tropical infectious

disease emergence in temperate areas are still scarce with most reports being associated with diseases transmitted by arthropod vectors (e.g. dengue, malaria and chikungunya) [2–5]. Considering the biology of snail vectors (in particular their limited dispersal ability), the emergence of tropical snail-borne diseases was not expected in Europe. However, clusters of autochthonous urogenital schistosomiasis cases were identified in southern Europe in 2014. Urogenital schistosomiasis is caused by the trematode species *Schistosoma haematobium*, a parasite transmitted to humans by freshwater *Bulinus* snails [6]. This disease is one form of bilharziasis, a disease

\*Correspondence: boissier@univ-perp.fr

<sup>1</sup> IHPE, University of Montpellier, CNRS, Ifremer, University of Perpignan Via Domitia, 66860 Perpignan, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



including a range of diseases responsible for more than 240 million cases in 78 countries across the world and responsible for between 1.7 and 4.5 million disability-adjusted life years (DALYs) every year [7, 8].

In April 2014, cases of urogenital schistosomiasis were simultaneously diagnosed in French and German hospitals with several local people infected [9–11]. Surprisingly, these European patients had never visited schistosomiasis endemic areas before (i.e. Arabian Peninsula or Africa [12]) and all patients were infected in August 2013 in Corsica, a French Mediterranean Island very popular for its touristic attractiveness [9–11]. The population in Corsica jumps from 300,000 people during the winter to 3 million people during the summer season. After a huge diagnostic campaign including 30,000 participants, 106 cases of urogenital schistosomiasis were linked to the water contact, by the patients, at specific sites on the Cavo River in southern Corsica. According to an epidemiological model built on an exhaustive dataset from the summer 2013 outbreak at the country scale, up to 338 (95% confidence interval 166–510) people could have been infected in Corsica, several of whom are probably asymptomatic with low level infections that will not be diagnosed.

In the summer of 2014, human access to the Cavo River was prohibited. However, in the summer of 2015 and 2016 new cases of local infections were identified hence strongly suggesting that transmission was ongoing and established in Corsica, with the life-cycle persisting in the local snails and tourists/locals [14, 15]. Moreover, genetic and phylogenetic analyses indicated that the schistosome strain established in Corsica is in fact a hybrid lineage resulting from the interbreeding between *S. haematobium* and *S. bovis* (a ruminant-associated schistosome species) highly likely originating from northern Senegal [16, 17].

In parallel with human diagnostics and surveillance, the snail intermediate hosts have regularly been collected and screened for possible schistosome infections every summer since 2014 [15]. *Bulinus* snails were collected weekly at the identified transmission sites along the Cavo River during the touristic season (from mid-June to mid-September), which also corresponds to the optimal period for transmission [17]. In particular, over this period, the water temperature is optimal for the development and release of schistosome cercarial larval stage from the infected snails, and the densities of potentially infected snails and humans are conjointly maximal. In 2014 and 2015, 3544 and 1965 snails, respectively, were tested for patent schistosome infections by cercarial shedding (i.e. looking for the emergence of schistosome cercarial larvae) and then in 2016 and 2017, 3453 and 5364 snails, respectively, were screened for schistosome

infection using a more sensitive PCR diagnostic assay. Surprisingly, from 14,326 snails analysed no positive snails were detected despite cases of urogenital schistosomiasis being diagnosed and hence confirming ongoing transmission [15]. This suggests that although there is little doubt that the schistosome persists at some specific sites, the schistosome density is locally low.

How the parasite maintains itself at such latitudes and, in particular, how parasites cope with local winter conditions still remain enigmatic [12]. Two non-exclusive hypotheses might explain the overwintering persistence of the parasite. First, only adult parasites in their human hosts survive during the winter and transmission persists through yearly release of schistosome eggs from infected individuals. Under this hypothesis, the persistence of the parasite year to year only relies on the release and re-seeding of schistosomes in the river every early summer by humans [13]. Secondly, at least some schistosome larvae survive during winter within their snail hosts. Under this hypothesis, infected snails, even if they are scarce, could contribute to the infection of humans from one summer season to another. This hypothesis implies that (i) infected local snails survive at low water temperatures over the winter, and (ii) schistosomes within their snail hosts also survive during the winter and can develop into mature cercariae to complete their life-cycle after wintering. However, the observed longevity of infected adult snails under classical experimental rearing conditions (i.e. temperature around 25 °C, photoperiod 12:12 h L:D) is generally low. Moreover, the environmental conditions during winter in temperate regions appear at first sight unfavourable for tropical parasites with complex life-cycles. As a result, this latter hypothesis is generally discarded.

In this study we experimentally test this last hypothesis. To this aim, we conducted a mesocosm experiment to (i) quantify the survival of healthy and infected snails and that of their schistosomes within their hosts to an experimental yet realistic temperate winter cycle; and (ii) quantify the ability of the schistosomes to complete their life-cycle after wintering. We measured the life history traits of different *Bulinus/Schistosoma* strain couples, including *Bulinus* from different tropical and temperate countries to test for potential local adaptation in temperate regions, and tropical schistosomes either pure *S. haematobium* or hybrids, to test for possible schistosome strain effects on both the snail and the schistosome survival in relation to cold stress.

## Methods

### Snail and schistosome strains

Three *Bulinus truncatus* (*B.t*) strains originating from Cameroon, Spain and Corsica and two *S. haematobium*



(*S.h*) strains originating from Cameroon (pure *S.h*) and Corsica (*S. haematobium-bovis* hybrid (*S.h-b*) were used in this study.

The *B.t* strain from Cameroon originated from the Barombi Kotto Lake (4°28'04"N, 9°15'02"W) in the southeast of Cameroon and was isolated in July 2015; the *B.t* strain from Spain originated from Almeria (36°44'54.8531"N, 2°47'54.0978"W) and was isolated in March 2015 and the *B.t* strain from Corsica was obtained from the Cavu River (41°43'26.86"N, 9°17'55.09"E) and was isolated in April 2014. All of these snail strains were reared under common laboratory environmental conditions for at least two generations before starting the experiment. This period was applied to avoid possible environmental and maternal effects on the observed response to the subsequent cold stress experiment.

The *S.h* strain from Cameroon originated from Barombi Kotto (4°28'04"N, 9°15'02"W) and was isolated in July 2015 from naturally-infected children [18] and the Corsica *S.h-b* hybrid strain was isolated from patients infected in Corsica in the summer of 2013 [17]. Nuclear (ITS2) and mitochondrial (*cox1*) gene sequencing revealed that the Cameroon *S.h* is a pure *S. haematobium* strain [18] and Corsica strain *S.h-b* is a hybrid strain resulting from the interbreeding between *S. bovis* and *S. haematobium* most likely originating from Senegal [17]. These two schistosome strains have been routinely maintained in the laboratory facilities using hamsters (*Mesocricetus auratus*) as definitive hosts and the strain-specific *B. truncatus* as the intermediate host (*B.t* Corsica for *S.h-b* Corsica and *B.t* Cameroon for *S.h* Cameroon) following classical protocols developed by our laboratory [19, 20].

### Snail infection

Schistosome eggs from the two strains were isolated from the liver of independently infected hamsters and then placed in freshwater and exposed to light to induce miracidial hatching. A total of 8 batches of size-normalised snails each (i.e. 3–5 mm) were individually exposed

to 5 schistosome miracidia to enable infection. These 8 batches included 4 batches of Corsican *B.t* exposed to the *S.h-b* from Corsica and 4 batches of Spanish *B.t* exposed to *S.h* from Cameroon. After exposure, snails were maintained in batches of 50 individuals in 5-l containers at 24 °C for 6 weeks. After 6 weeks, the exposed snails were individually placed in fresh water in a well of a 24-well plate and exposed to light for 2 h to stimulate cercarial shedding. Shedding snails were observed under a binocular microscope and only snails emitting cercariae were kept. From these infected snails we constituted 8 batches of 12 individuals maintained in 500 ml tanks. These 8 batches correspond to the eight snail/schistosome combinations tested (Table 1). Twelve other batches of 12 non-exposed snails were constituted and maintain in 500 ml tanks. These 12 batches included 3 batches of each snail strain (Cameroon, Corsica and Spain).

### Temperature testing

The temperature testing consisted of a four-step protocol (Fig. 1): a progressive decrease in temperature over 4 weeks; a long-term maintenance at specific “winter temperature” for 14 weeks; and a progressive increase in temperature over 3 weeks with cercarial shedding checked for a further 4 weeks. One control temperature (24 °C) and three “winter temperatures” (4, 8 and 16 °C) were tested for each infection (Table 1). This range of temperatures was selected to mimic the thermal dynamics measured *in natura* at three sites where the transmission of urogenital schistosomiasis was previously identified in the Cavu River [17] (Fig. 2). A temperature of 24 °C is optimal for snail and schistosome development leading to cercarial shedding and was used as a control. This optimal temperature also corresponds to normal summer temperature experienced by natural snail populations in the Cavu River (Fig. 2).

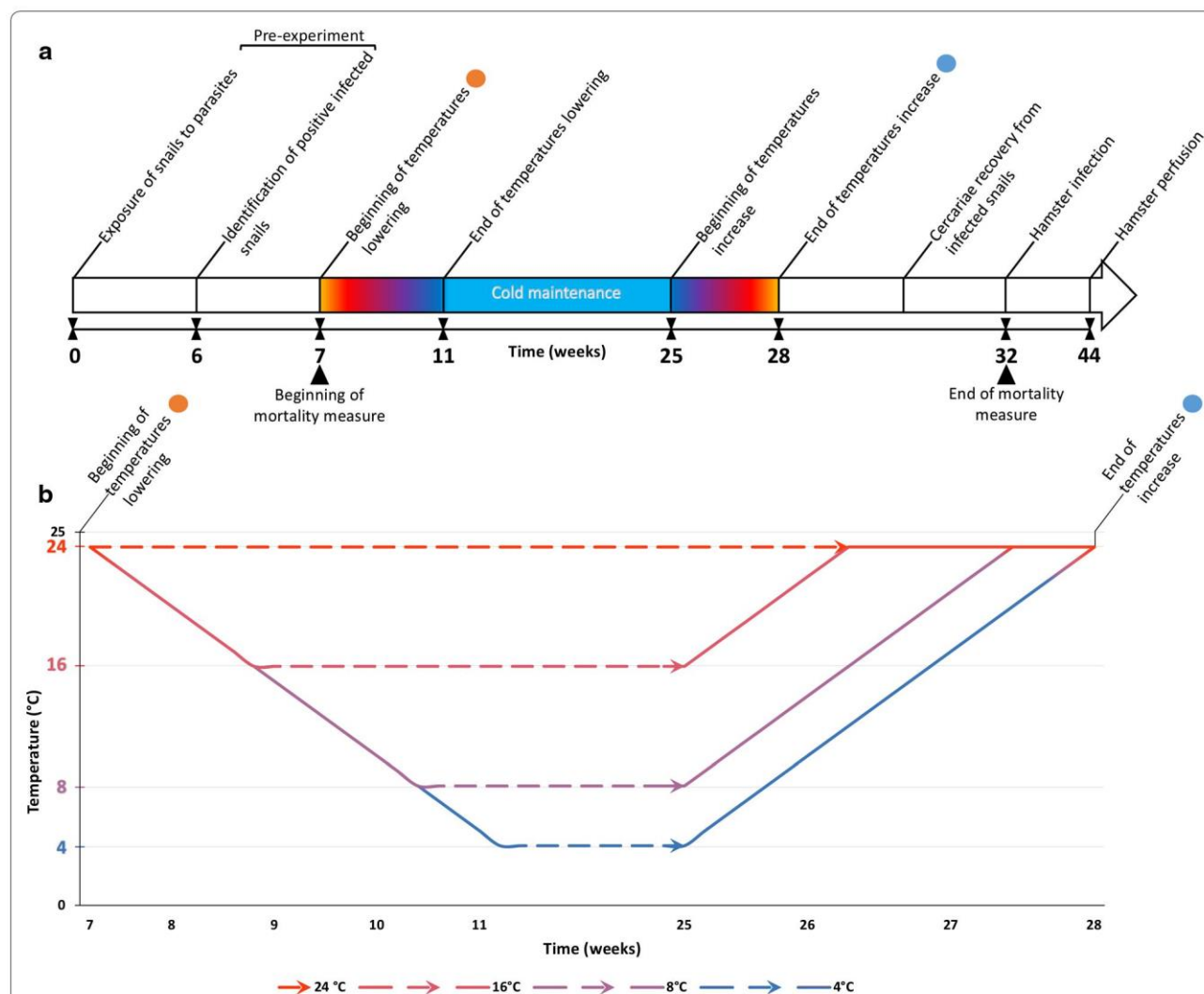
The study was conducted by placing the different tanks of 500 ml containing the snails in different 60-l freshwater tanks maintained at the different required temperatures (bain-marie). For the uninfected and infected

**Table 1** Mollusc and parasite combinations tested during the winter experiment

| Parasite/mollusc                                    | <i>S. haematobium</i><br>Corsica ( <i>S.h-b</i> ) | <i>S. haematobium</i><br>Cameroon ( <i>S.h</i> ) | Uninfected   |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|
| <i>B. truncatus</i> Corsica ( <i>B.t</i> Corsica)   | (12)*4                                            | Not tested                                       | (12)*4       |
| <i>B. truncatus</i> Spain ( <i>B.t</i> Spain)       | Not tested                                        | (12)*4                                           | (12)*4       |
| <i>B. truncatus</i> Cameroon ( <i>B.t</i> Cameroon) | Not tested                                        | Not tested                                       | (12)*4       |
| Temperature treatments (°C)                         | 24, 16, 8, 4                                      | 24, 16, 8, 4                                     | 24, 16, 8, 4 |

**Notes:** The values displayed represent the number of molluscs used for each combination. All of these combinations were replicated for each temperature treatments, representing 5 batches of 12 molluscs for each temperature and a total of 20 batches of 12 molluscs. Other combinations like *B.t* Cameroon and *S.h* Cameroon were not tested as they are not relevant to the present study (i.e. the establishment of tropical parasites in European *B. truncatus* molluscs)





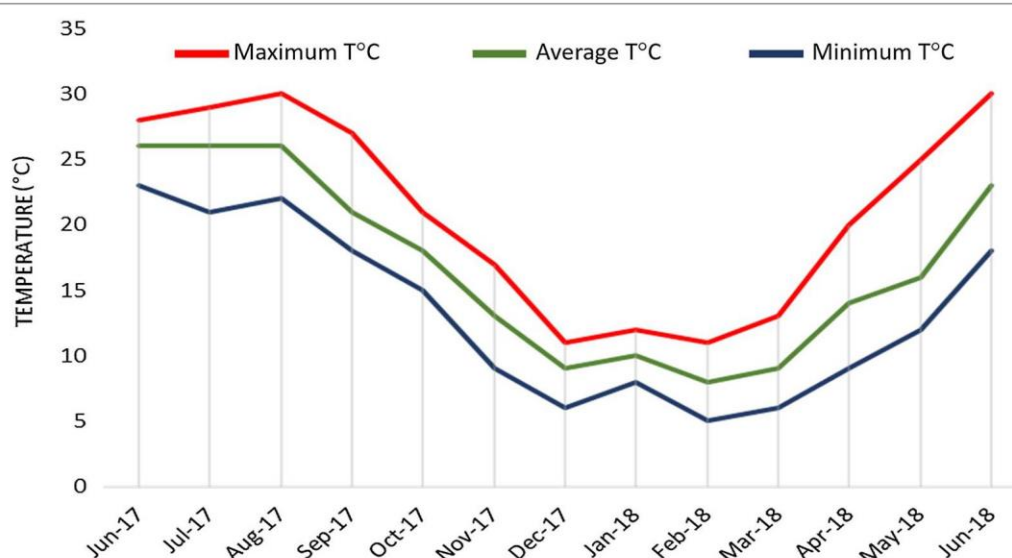
**Fig. 1** Time schedule of the experimental protocol. **a** The timing of the entire experiment. **b** The temperature kinetics of the winter experiment. All the values in abscissa represent the time in weeks between each step

control batches, kept at the normal temperature of 24 °C, the 500-ml freshwater containers were maintained on a laboratory bench in the snail room which is routinely kept at 24 °C. After acclimatisation for one week at 24 °C, the temperature was lowered at a rate of 1 °C every 2 days until the experimental winter temperatures reached 16 °C, 8 °C and 4 °C, respectively. The temperature was lowered using chiller devices (AquaVie Ice 1200/2000; Aqua Store, Dagneux, France) and a water pump system to mix the water to maintain a constant temperature throughout the bain-marie. For the batches maintained at 4 °C, the containers were placed in a fridge at 4 °C. All batches of snails, independent of temperature, were exposed to the same photoperiod (12:12 h L:D). A total of 4 weeks was thus needed to progressively decrease

the temperature for the different batches after which they were maintained for 14 weeks for the 8 °C and 16 °C batch and 10 weeks for the 4 °C batch. After this cold exposure, the temperature was progressively increased at a rate of 1 °C/day for all aquaria until the control temperature was reached (i.e. 24 °C).

#### Checking for schistosome survival after the cold exposure

Once the snails had been returned to their normal temperature of 24 °C they were individually checked for cercarial shedding as described previously. This was done on a weekly basis for 4 weeks. Pooled cercariae coming from the *S.h* Corsican strain maintained at 8 °C were used to expose hamsters. A total of 400 cercariae were used to individually expose 3 hamsters



**Fig. 2** Temperatures recorded in the Cavu River from June 2017 to May 2018. Three sites where cases of urogenital schistosomiasis have been previously identified in the Cavu River: site 5, 41°42'16.82"N, 9°20'5.23"E; site 8, 41°43'12.22"N, 9°18'6.27"E; and site 9, 41°43'53.14"N, 9°17'36.87"E. The values recorded for each of the three sites are pooled and averaged over the month

using the routine procedure [19, 21, 22]. Hamsters were sacrificed 90 days after cercarial exposition and adult schistosomes were recovered using the hepatic perfusion technique [19, 21, 22].

During all the experiments, snails were fed *ad libitum* with fresh lettuce 3 times a week. All juvenile snails that hatched from eggs laid during the experiment were removed. Snail mortality was monitored once a week, from the beginning of temperature lowering period until the end of the shedding inspection period (i.e. a total of 25 weeks). Individual mortality was visually inferred by inspecting the presence/absence of heartbeats (through the shell transparency) under a binocular microscope. This trait is commonly measured to infer the effect of schistosomes on the snail health [23]. All confirmed dead individuals were recorded and removed from the aquariums.

#### Data analysis

Mortality data were used to generate survival tables and Kaplan-Meier curves. Snail survival distributions were compared using log-rank tests in SPSS v.23.0 (IBM, New York, USA).

#### Results

All data from the different batches of snails are shown in Table 2.

**Table 2** Survival for each mollusc-parasite combination observed at the end of the experiment

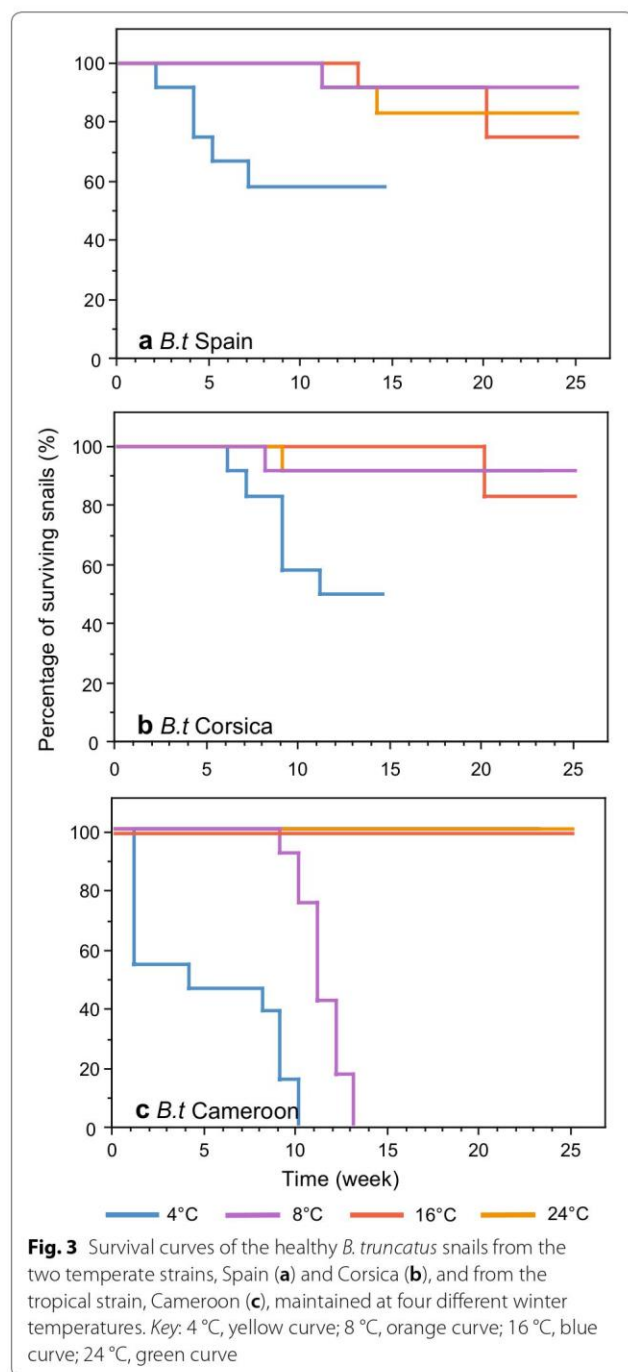
| Healthy molluscs           |              | Infected molluscs                       |              |
|----------------------------|--------------|-----------------------------------------|--------------|
| T (°C): Mollusc strain     | Survival (%) | T (°C) Mollusc/parasite strain          | Survival (%) |
| 4 °C: <i>B.t</i> Spain     | 58 (n = 7)   | 4 °C: <i>B.t</i> Spain/ <i>S.h</i>      | 33 (n = 4)   |
| 8 °C: <i>B.t</i> Spain     | 92 (n = 11)  | 8 °C: <i>B.t</i> Spain/ <i>S.h</i>      | 83 (n = 10)  |
| 16 °C: <i>B.t</i> Spain    | 75 (n = 9)   | 16 °C: <i>B.t</i> Spain/ <i>S.h</i>     | 100 (n = 12) |
| 24 °C: <i>B.t</i> Spain    | 83 (n = 10)  | 24 °C: <i>B.t</i> Spain/ <i>S.h</i>     | 17 (n = 2)   |
| 4 °C: <i>B.t</i> Corsica   | 50 (n = 6)   | 4 °C: <i>B.t</i> Corsica/ <i>S.h-b</i>  | 42 (n = 5)   |
| 8 °C: <i>B.t</i> Corsica   | 92 (n = 11)  | 8 °C: <i>B.t</i> Corsica/ <i>S.h-b</i>  | 83 (n = 10)  |
| 16 °C: <i>B.t</i> Corsica  | 83 (n = 10)  | 16 °C: <i>B.t</i> Corsica/ <i>S.h-b</i> | 83 (n = 10)  |
| 24 °C: <i>B.t</i> Corsica  | 92 (n = 11)  | 24 °C: <i>B.t</i> Corsica/ <i>S.h-b</i> | 8 (n = 1)    |
| 4 °C: <i>B.t</i> Cameroon  | 0 (n = 0)    |                                         |              |
| 8 °C: <i>B.t</i> Cameroon  | 0 (n = 0)    |                                         |              |
| 16 °C: <i>B.t</i> Cameroon | 100 (n = 12) |                                         |              |
| 24 °C: <i>B.t</i> Cameroon | 100 (n = 12) |                                         |              |

Notes: Number of molluscs in parentheses (n). All infected molluscs emitted cercariae at the end of the experiment

Abbreviations: *B.t*, *Bulinus truncatus*; *S.h*, *Schistosoma haematobium* pure strain from Cameroon; *S.h-b*, *Schistosoma haematobium* × *S. bovis* Corsican hybrid strain; T, temperature

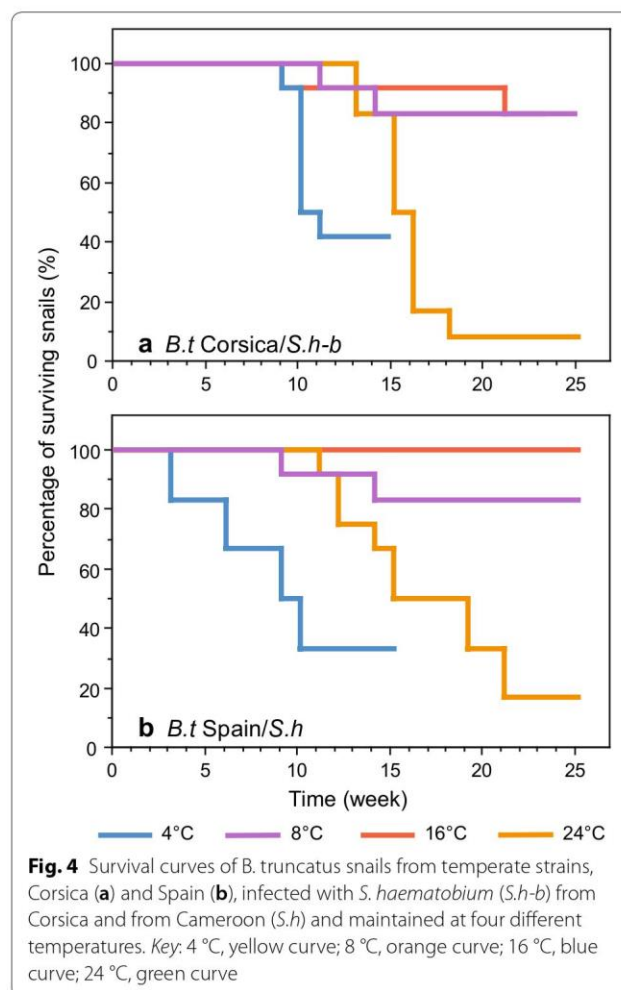
#### Survival of uninfected snails

Survival curves for the three strains of uninfected *B.t* strains are presented in Fig. 3. No mortality was observed during the temperature lowering period. The survival



**Fig. 3** Survival curves of the healthy *B. truncatus* snails from the two temperate strains, Spain (a) and Corsica (b), and from the tropical strain, Cameroon (c), maintained at four different winter temperatures. Key: 4 °C, yellow curve; 8 °C, orange curve; 16 °C, blue curve; 24 °C, green curve

curves obtained for the snails maintained at the four experimental temperatures were significantly different irrespective to the snail strain (Corsica:  $\chi^2=13.79$ ,  $df=3$ ,  $P<0.01$ ; Spain:  $\chi^2=8.09$ ,  $df=3$ ,  $P<0.05$ ; Cameroon:  $\chi^2=80.18$ ,  $df=3$ ,  $P<0.01$ ). At 16 °C and 24 °C all *B.t* strains had a highest survival rate and we did not observe statistical difference between the three *B.t* strains ( $\chi^2=3.23$ ,  $df=2$ ,  $P>0.05$  for 16 °C and  $\chi^2=2.03$ ,  $df=2$ ,  $P>0.05$  for 24 °C). Conversely, significant differences



**Fig. 4** Survival curves of *B. truncatus* snails from temperate strains, Corsica (a) and Spain (b), infected with *S. haematobium* (*S.h-b*) from Corsica and from Cameroon (*S.h*) and maintained at four different temperatures. Key: 4 °C, yellow curve; 8 °C, orange curve; 16 °C, blue curve; 24 °C, green curve

were observed between the survival curves obtained from the *B.t* snails from Cameroon (tropical) and those from Corsica and Spain (temperate) when exposed to the two lowest temperatures (4 °C:  $\chi^2=14.47$ ,  $df=2$ ,  $P<0.01$ ; 8 °C:  $\chi^2=31.55$ ,  $df=2$ ,  $P<0.01$ ). In particular, all *B.t* from Cameroon died 10 weeks (4 °C) and 13 weeks (8 °C) after the beginning of the experiment while 50% of snails from Spain and Corsica survived when kept at 4 °C and 90% of the snails survived kept at 8 °C. No significant difference was observed between the survival curves obtained for the *B.t* from Spain and Corsica, irrespective to the temperature treatment (4 °C:  $\chi^2=0.007$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ; 8 °C:  $\chi^2=0.001$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ; 16 °C:  $\chi^2=0.31$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ; 24 °C:  $\chi^2=0.305$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ).

#### Survival of infected snails

The survival curves for the infected Corsican and Spanish *B.t* strains are shown in Fig. 4. No mortality was observed during the temperature lowering period. No significant differences were observed between the two host/



schistosome combinations tested (4 °C:  $\chi^2=1.44$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ; 8 °C:  $\chi^2=0.001$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ; 16 °C:  $\chi^2=2.09$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ; 24 °C:  $\chi^2=0.60$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ). The highest mortality was observed at 24 °C (the control temperature) with only 8 and 17% of Corsican and Spanish snails surviving, respectively. Moreover, no statistical difference was observed between the survival profile of the infected *versus* uninfected snails from either the *B.t* Corsica or the *B.t* Spain strains at 4 °C ( $\chi^2=0.37$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ), 8 °C ( $\chi^2=0.66$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ) or 16 °C ( $\chi^2=1.40$ ,  $df=1$ ,  $P>0.05$ ).

### Cercariae shedding and infectivity

Four weeks after the snails had been returned to their natural temperature of 24 °C all the infected snails who survived the colder temperatures were still infected and emitted schistosome cercariae, independent of the temperatures that they had been maintained at. The number of surviving infected snails are presented in (Table 2). Pooled cercariae coming from the *S.h-b* Corsican strain maintained at 8 °C were used to expose hamsters. After 90 days of infection, 72, 84 and 104 adult worms successfully developed from each of the three exposed hamsters. These proportions are similar to the 25% cercariae infection success commonly obtained through routine laboratory passaging.

### Discussion

Our study demonstrates that (i) *B. truncatus* can survive during a long-term cold period; (ii) *B. truncatus* originating from temperate regions (i.e. Spain, Corsica) better survive to cold stress than the tropical strain (i.e. Cameroon); (iii) infected snails display a higher survival rate at cold temperature than at the theoretical (higher) optimal temperature, and (iv) the schistosomes inside their snail hosts survive cold stress for several weeks and produce viable cercariae once returned to optimal temperatures.

Our results show that *B. truncatus* is resilient to cold temperatures independent of its geographical origin and that snails from the temperate region (Corsica and Spain) resist better than snails from the tropical region (Cameroon). Even tropical snails from Cameroon can survive for periods at 16 °C for up to 25 weeks. This temperature is far lower than those experienced by the natural populations in Cameroon (i.e. higher than 29 °C) [24, 25] and experienced in most other tropical countries. Remarkably, *B. truncatus* strains from the temperate region (Spain and Corsica) are fully resistant to very low temperatures, such as 4 °C for at least ten weeks, which is lower than the temperatures observed in Cavu River during the winter. The strong difference in thermal resistance observed between temperate and tropical *B. truncatus* strains is a signature of local adaptation. This local thermal

adaptation has been reported in several groups of plants or animals [26–29] but only in arthropods regarding disease vectors [30]. Local adaptations have been poorly studied in freshwater snails and studies have mainly focused on extreme environmental shifts, for examples the thermal adaptation of specific strains of *Radix balthica* (family Lymnaeidae) to some geothermal springs in northern Iceland has been reported [31].

The effect of temperature on the growth, fecundity and survival of their parasitic schistosomes within their snail hosts (*Bulinus* sp. and *Biomphalaria* sp.) has been recently reviewed [32]. This synthesis shows that, in the current context of global warming, most studies focused on the effect of increasing temperature with only a few case studies on the ability of snails to cope with colder conditions [32]. However, in light of the urogenital schistosomiasis outbreak in Corsica, it is also particularly relevant to quantify the effect of cold temperatures on snail life history traits to better predict the potential spread of *B. truncatus* and the risk of schistosomiasis transmission at higher latitudes. Similar cold resistance has been shown previously in uninfected snails from Egypt, although to less extreme temperatures, with only 2% and 6% of mortality after 2 weeks at 10 °C and 15 °C, respectively [33]. More recently, a study has investigated cold resistance of *B. globosus*, another schistosome snail vector in South Africa [34]. In this study, more than 85% of the snails survived after 12 weeks at 15.5 °C [34]. Together with our study, these findings indicate that *Bulinus* sp. can tolerate a range of temperatures including cold temperatures and are thus adapted to environments with fluctuating temperatures [35]; hence, *B. truncatus* snails are endemic in several temperate countries including France, Spain, Portugal, Greece and Italy [9, 12, 36, 37]. In comparison, *Biomphalaria* sp., a snail vector of human intestinal schistosomiasis displays a much narrower thermal niche [32] with *Biomphalaria tenagophila* being the only species of this genus that has been identified in a temperate climate (i.e. Romania [38]).

Our results also show that temperature has a significant impact on the survival of infected snails irrespective of the origin of the infecting schistosome (temperate or tropical region). Indeed, mortality substantially increased in infected snails kept at normal temperatures; however, it is interesting that snail survival rates were higher and similar in infected and uninfected snails at cold temperatures (4 °C, 8 °C or 16 °C). It is known that parasitism is expected to alter several fitness traits of their host snails, including thermal tolerance. We here interpret these results as an effect of cold stress on the development of schistosomes inside their host and not (or at least indirectly) on the snails. Indeed, in schistosome-snail interactions, temperature



directly influences the development and several life history traits of the schistosome with optimal trait values observed around 25 °C [39]. Below this optimal temperature, the ability of miracidia to infect their host snails decreases [40–43], the length of the prepatent period increases [34, 41, 42, 44] and the number of cercariae emitted decreases [34, 41, 42, 44]. Our study shows that at 4 °C, 8 °C and 16 °C, the mortality of snails either infected or not does not differ significantly. This means that schistosome infection does not induce any fitness cost on snails additionally to cold stress. This might be explained by the fact that at these temperatures, the schistosomes enter diapause to overwinter and the possible effect of schistosomes on their hosts is thus limited. Conversely, unlike uninfected snails, whatever the strain considered almost all the infected snails died before the end of the experiment at 24 °C, as a consequence of a normal parasite development. In the light of these results we argue that cold temperatures inhibit the development and activity of the schistosomes within their hosts, hence maintaining the fitness of infected snails. In natural populations, infected snails are highly likely to overwinter in temperate countries as well as the uninfected populations. In relation to the Corsican outbreak it is highly possible that the maintenance of infected snails overwinter, at least partly, will contribute to the continued transmission of urogenital schistosomiasis from one summer to another. Importantly, however, schistosome infection intensity in snails is extremely low even during the summer [45] and so the contribution of overwintering infected snails in the maintenance of schistosomes in the river is likely to be very low.

Lastly, our results show that schistosomes better tolerate cold temperatures compared to their snail hosts, at least in the case of the tropical strains (i.e. from Cameroon). Indeed, all the uninfected *Bulinus* snails from Cameroon died after 13 weeks at 8 °C. Conversely schistosomes originating from all geographical areas, both temperate and tropical, can survive temperatures as low as 4 °C with the production of viable cercariae. Moreover, although not in all combinations of schistosome-snail strains, our results indicate that hybridisation between *S. haematobium* and *S. bovis*, which is the *S.h-b* Corsican strain (probably originating from Senegal) does not induce any changes in terms of thermal tolerance compared to the pure *S. haematobium* strain from Cameroon. Together these results strongly suggest that schistosomes from tropical areas, irrespective of their geographical origin and nature (i.e. pure or hybrid), are able to spread and settle in temperate regions, provided that locally adapted populations of *B. truncatus* are already established. In an epidemiological context, this means that the spread of

schistosomiasis northward in Europe is currently limited by the adaptive potential of *B. truncatus* to colder temperatures and not by some physiological constraints of the schistosomes in relation to colder environments.

As a final point of interest, the overwintering period in temperate latitudes is analogous to the aestivation period known in tropical areas (see [46]). It is well established that several schistosome intermediate host species (including *B. truncatus*) have the ability to aestivate [46]. It has been demonstrated that aestivation negatively affects the survival of infected snails [47, 48]. In our experiments cold temperatures did not affect *B. truncatus* snails, regardless of their infection status. Interestingly, it has been evidenced that an aestivation period stops the sporocyst development [49] and does not affect cercariae [50]. Based on these previous studies and our results, we argue that the ability of schistosomes to enter dormancy is a pre-adaptation to cope with stressful environmental conditions experienced by their snail hosts.

## Conclusions

With ongoing climate change, temperature patterns can fluctuate drastically in time and space [51]. Here, we showed that temperatures can influence the biology of freshwater snails and the interactions with their schistosomes. The data support the hypothesis that the most limiting factor in assessing the ability of schistosomes to invade new areas is essentially limited by the physiological constraints of snail hosts to low temperatures. Thereby, the definition of the host's thermal niche is a key element when estimating the risks of schistosomiasis spreading throughout southern Europe. Given the intensity of current temperature changes and their geographical variability, it is difficult to predict, on a large scale, the impact that this may have on the transmission dynamics of infectious diseases. These facts add a degree of complexity in the management of disease outbreaks [12]. For this purpose, ecological niche modelling approaches may be important for predicting the presence of *B. truncatus* snails in Europe and their ability to transmit medically important schistosome species. These tools were recently used to predict the distribution of snail species involved in schistosomiasis and fasciolosis transmission [52, 53] whilst also enabling predictions on the effect of climatic change and anthropogenic activities (e.g. land use), which also impact schistosomiasis transmission [54]. Previous studies have predicted a reduction of suitable ecological niches for three species of freshwater snails involved in parasitic disease transmission, and the appearance of suitable zones in areas that were previously unfavourable [52, 53]. These changes not only change the distribution of the snail hosts but also the parasites that they transmit.

## Abbreviations

*S.h.*: *Schistosoma haematobium* (pure strain); *S.b.*: *Schistosoma bovis* (pure strain); *S.h-b.*: *Schistosoma haematobium-bovis* (hybrid Corsican strain); *B.t.*: *Bulinus truncatus*; DALYs: disability-adjusted life years.

## Acknowledgements

We thank the French agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety for their technical and financial support in studies on the emergence of schistosomiasis in Corsica. This study is set within the framework of the "Laboratoire d'Excellence (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41).

## Authors' contributions

JB conceived the original idea. JB and SM carried out the experiment with support from NA for the care of animals. JB, SM and OR analysed and interpreted the data. SM drafted the manuscript. JB, OR, SM and SMC revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This study was funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), the ANR (Grant No. ANR-18-CE35-0001) (Program HySWARM) and the Occitania region (Project MOLRISK). This study was also funded by Health Research Project no. PI16/00520, Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento de la Acción Estratégica en Salud (AES), Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación, ISCIII and Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain.

## Availability of data and materials

The dataset supporting the conclusions of this article is included within the article.

## Ethics approval and consent to participate

All infection experiments were carried out according to national ethical standards established in the writ of February 1, 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 Ministère de l'Agriculture et de la Pêche and the French Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie provided permit A66040 to the laboratory for animal experiments and certificates to the experimenters (authorisation 007083, decrees 87–848). For the Cameroonian parasite strain approval was obtained from the Institutional Ethic Committee of the Mountain University (Bangangté, Cameroon). For the Corsican parasite strain the sampling was carried out with the approval of the French Commission for Data Protection (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) as part of the public health response.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Author details

<sup>1</sup> IHPE, University of Montpellier, CNRS, Ifremer, University of Perpignan Via Domitia, 66860 Perpignan, France. <sup>2</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, Burjassot, 46100 Valencia, Spain.

Received: 4 June 2019 Accepted: 23 July 2019

Published online: 29 July 2019

## References

- Kim KH, 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;32:299–318.
- Schaffner F, Fontenille D, Mathis A. Autochthonous dengue emphasises the threat of arbovirois in Europe. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:1044.
- Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:1271–80.
- 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;16:1702–4.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007;370:1840–6.
- Rollinson D, Stothard JR, Southgate VR. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. *Parasitology*. 2003;123:245–60.
- WHO. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2016. *Wkly Epidemiol Rec*. 2017;49:11.
- Hay SI, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, et al. 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. *Lancet*. 2017;390:1260–344.
- Boissier J, Mone H, Mita G, Barges MD, Molyneux D, Mas-Coma S. Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infect Dis*. 2015;15:757–8.
- Holtfreter MC, Mone H, Muller-Stover I, Mouahid G, Richter J. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Euro Surveill*. 2014;19:22.
- Berry A, Mone H, Iriart X, Mouahid G, Abo O, Boissier J, et al. Schistosomiasis haematobium, Corsica, France. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1595–7.
- Kincaid-Smith J, Rey O, Toulza E, Berry A, Boissier J. Emerging schistosomiasis in Europe: a need to quantify the risks. *Trends Parasitol*. 2017;33:600–9.
- Noel H, Ruello M, Maccary A, Pelat C, Sommen C, Boissier J, et al. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect*. 2017;24:295–300.
- 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. *Euro Surveill*. 2016;21:1.
- Ramalli L, Mulero S, Noel H, Chiappini JD, Vincent J, Barre-Cardi H, et al. Persistence of schistosomal transmission linked to the Cava river in southern Corsica since 2013. *Euro Surveill*. 2018;23:4.
- Mone H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsu-Nguema R, Ibikounle 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;114:4127–33.
- 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;16:971–9.
- 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*. 2016;10:e0005138.
- Boissier J, Chlichli K, Digon Y, Ruppel A, Mone H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 2003;91:144–50.
- Boissier J, Mone H. Male-female larval interactions in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. *Int J Parasitol*. 2001;31:352–8.
- Boissier J, Mone H. Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology*. 2000;121:379–83.
- Boissier J, Mone H. Relationship between worm burden and male proportion in *Schistosoma mansoni* experimentally infected rodents and primates. A meta-analytical approach. *Int J Parasitol*. 2001;31:3.
- Williams CL, Gilbertson DE. Altered feeding response as a cause for the altered heartbeat rate and locomotor activity of *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol*. 1983;69:671–6.
- Campbell SJ, Stothard JR, O'Halloran F, Sankey D, Durant T, Ombede DE, et al. Urogenital schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis (STH) in Cameroon: an epidemiological update at Barombi Mbo and Barombi Kotto crater lakes assessing prospects for intensified control interventions. *Infect Dis Pov*. 2017;6:49.
- Trewasas P, Green J, Corbet SA. Ecological studies on crater lakes in West Cameroon Fishes of Barombi Mbo. *J Zool*. 1972;167:41–95.



26. Muir AP, Biek R, Thomas R, Mable BK. Local adaptation with high gene flow: temperature parameters drive adaptation to altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Mol Ecol*. 2014;23:561–74.
27. O'Donnell DR, Hamman CR, Johnson EC, Kremer CT, Klausmeier CA, Litchman E. Rapid thermal adaptation in a marine diatom reveals constraints and trade-offs. *Glob Chang Biol*. 2018;24:4554–65.
28. Card DC, Schield DR, Castoe TA. Plasticity and local adaptation explain lizard cold tolerance. *Mol Ecol*. 2018;27:2173–5.
29. Rey O, Estoup A, Vonshak M, Loiseau A, Blanchet S, Calcatera L, et al. Where do adaptive shifts occur during invasion? A multidisciplinary approach to unravelling cold adaptation in a tropical ant species invading the Mediterranean area. *Ecol Lett*. 2012;15:1266–75.
30. Sternberg ED, Thomas MB. Local adaptation to temperature and the implications for vector-borne diseases. *Trends Parasitol*. 2014;30:115–22.
31. Johansson MP, Laurila A. Maximum thermal tolerance trades off with chronic tolerance of high temperature in contrasting thermal populations of *Radix balthica*. *Ecol Evol*. 2017;7:3149–56.
32. Kalinda C, Chimbari M, Mukaratirwa S. Implications of changing temperatures on the growth, fecundity and survival of intermediate host snails of schistosomiasis: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14:1.
33. El-Hassan AA. Laboratory studies on the direct effect of temperature on *Bulinus truncatus* and *Biomphalaria alexandrina*, the snail intermediate hosts of schistosomes in Egypt. *Folia Parasitol (Praha)*. 1974;21:181–7.
34. Kalinda C, Chimbari MJ, Mukaratirwa S. Effect of temperature on the *Bulinus globosus*-*Schistosoma haematobium* system. *Infect Dis Poverty*. 2017;6:57.
35. Marti H. Field observations on the population dynamics of *Bulinus globosus*, the intermediate host of *Schistosoma haematobium* in the Ifakara area, Tanzania. *J Parasitol*. 1986;72:119–24.
36. Martínez-Ortí A, Bargues MD, Mas-Coma S. Dos nuevas localizaciones para España de *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) (Gastropoda, Planorbidae), hospedador intermediario de schistosomiasis urinaria. *AMZ*. 2015;13:25–31.
37. Welter-Schultes FW. European non-marine molluscs, a guide for species identification. 1st ed. Göttingen: Planet Poster Editions; 2012.
38. Majoros G, Feher Z, Deli T, Foldvari G. Establishment of *Biomphalaria tenagophila* snails in Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1812–4.
39. McCreesh N, Booth M. The effect of simulating different intermediate host snail species on the link between water temperature and schistosomiasis risk. *PLoS One*. 2014;9:e87892.
40. Coelho JR, Bezerra FS. The effects of temperature change on the infection rate of *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:223–4.
41. Roushdy MZ, el-Emam M. The effect of temperature on inter-relationship between *Schistosoma haematobium* and *Bulinus truncatus* in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*. 1984;70:95–103.
42. Pfluger W, Roushdy MZ, El Emam M. The prepatent period and cercarial production of *Schistosoma haematobium* in *Bulinus truncatus* (Egyptian field strains) at different constant temperatures. *Z Parasitenkd*. 1984;70:95–103.
43. Chu KY, Massoud J, Sabbaghian H. Host-parasite relationship of *Bulinus truncatus* and *Schistosoma haematobium* in Iran. 3. Effect of water temperature on the ability of miracidia to infect snails. *Bull World Health Organ*. 1966;34:131–3.
44. Pfluger W. Experimental epidemiology of schistosomiasis. I. The prepatent period and cercarial production of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* snails at various constant temperatures. *Z Parasitenkd*. 1980;63:159–69.
45. Basch PF. Schistosomes: development, reproduction, and host relations. New York: OUP; 1991. p. 43.
46. Rubaba O, Chimbari MJ, Mukaratirwa S. The role of snail aestivation in transmission of schistosomiasis in changing climatic conditions. *Afr J Aquat Sci*. 2016;41:143–50.
47. Woolhouse MEJ, Taylor P. Survival rates of *Bulinus globosus* during aestivation. *Ann Trop Med Parasitol*. 1990;84:293–4.
48. White MM, Fried B, Sherma J. Effects of aestivation and starvation on the neutral lipid and phospholipid content of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 2007;93:1–3.
49. Barbosa FS, Barbosa I. Dormancy during the larval stages of the trematode *Schistosoma Mansoni* in snails estivating on the soil of dry natural habitats. *Ecology*. 1958;39:763–4.
50. Badger LI, Oyerinde JPO. *Schistosoma mansoni*: effect of aestivation on the intra-molluscan stages and the survival rate of infected *Biomphalaria pfeifferi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1996;90:617–20.
51. Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, et al. Climate change 2001: the scientific basis. In: Contribution of Working Group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge, UK and New York, USA: CUP; 2001.
52. Cordellier M, Pfenninger M. Inferring the past to predict the future: climate modelling predictions and phylogeography for the freshwater gastropod *Radix balthica* (Pulmonata, Basommatophora). *Mol Ecol*. 2009;18:534–44.
53. Pedersen UB, Stendel M, Midzi N, Mduluzi T, Soko W, Stensgaard AS, et al. Modelling climate change impact on the spatial distribution of fresh water snails hosting trematodes in Zimbabwe. *Parasit Vectors*. 2014;7:536.
54. Tanser F, Azongo DK, Vandormael A, Barnighausen T, Appleton C. Impact of the scale-up of piped water on urogenital schistosomiasis infection in rural South Africa. *Elife*. 2018;7:e33065.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





### c. Le rôle des hôtes réservoirs domestiques et sauvages dans le processus d'émergence

- **Publication 2** : Oleaga, A. ; Rey, O. ; Polack, B. ; Grech-Angelini, S. ; Quilichini, Y. ; Perez-Sanchez, R. ; Boireau, P. ; **Mulero, S.** ; Brunet, A. ; Rognon, A. ; Vallee, I. ; Kincaid-Smith, J. ; Allienne, J. F. ; Boissier, J. (2019). Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission? *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(6): e0007543. Doi: 10.1371/journal.pntd.0007543

Avec l'étude précédente nous avons avancé des arguments en faveur de l'hypothèse de la persistance intramolluscale du parasite, en effet, la souche de *S. haematobium* isolée en Corse est tout à fait capable de survivre tout un hiver dans son mollusque hôte intermédiaire (Mulero et al., 2019). Cependant, cette théorie paraît limitée compte tenu de la longévité de *B. truncatus*. En effet ces mollusques peuvent vivre de 170 jours voire 9 mois en laboratoire dans des conditions dites optimales (Chu, Sabbaghian, and Massoud, 1966 ; données non publiées). Toujours est-il que cette hypothèse ne prenait pas encore en compte les résultats de notre première étude en particulier le ralentissement du développement intramolluscal du parasite en réponse aux baisses de température (Mulero et al., 2019). Bien que le paramètre longévité d'un mollusque infecté n'ait pas encore été formellement testée, l'existence locale d'un hôte vertébré autre que l'Homme semblait donc être l'hypothèse la plus probable pour expliquer le cas identifié entre 2015 et 2016 en Corse. En effet, outre la capacité de *S. haematobium* à persister localement dans son hôte mollusque, le caractère hybride de la souche de parasite isolé en Corse (Mone et al., 2015) pourrait également contribuer à cette émergence et à la persistance locale de cette lignée.

Nous savons que la souche de *S. haematobium* isolée en Corse s'est révélée être un hybride entre un schistosome infectant l'Homme, *S. haematobium*, et un schistosome infectant les ruminants et les rongeurs sauvages, *S. bovis*. À cet égard, *S. bovis* avait déjà été identifiée dans des élevages en Corse au milieu du siècle dernier (Doby, Rault, Deblock, & Chabaud, 1966a). Cette hybridation peut avoir un impact non négligeable sur la transmission

de cette souche de schistosome, notamment sur le filtre de compatibilité du parasite que j'ai présenté en début de chapitre. De fait, le spectre d'hôtes compatibles (*i.e.* l'ensemble des espèces compatibles avec le parasite) aussi bien au niveau des d'hôtes intermédiaires que des hôtes définitifs pourrait être élargi à de nouvelles espèces établie en Corse (Kincaid-Smith et al., 2017; Kincaid Smith, 2018), notamment à des hôtes définitifs de la faune sauvage ou domestique (King, Stelkens, Webster, Smith, & Brockhurst, 2015).

Il nous a donc fallu déterminer si la souche de schistosome établie en Corse pouvait persister localement sans l'intervention de l'Homme, en infectant des animaux domestiques et/ou sauvages. Un phénomène déjà suggéré pour une souche hybride de schistosome au Sénégal, pays d'origine de la souche établie en Corse, où le parasite a été retrouvé dans des rongeurs sauvages (Catalano et al., 2018), et plus récemment au Bénin dans du bétail domestique (Savassi et al., 2020). Pour répondre à cette question, nous avons évalué la capacité de la souche hybride établie en Corse de *S. haematobium* à infecter des hôtes vertébrés autres que l'Homme en combinant une enquête séro-épidémiologique menée sur 3519 ruminants en Corse ainsi qu'une campagne de piégeage de rongeurs le long du Cavu et plus particulièrement autour des foyers de transmission connus dans cette rivière.

Sur les 3519 animaux domestiques testés en sérologie, soit 1147 bovins, 671 chèvres et 1701 moutons répartis sur 160 fermes sur 14 municipalités dans tout le sud de la Corse. Seulement 17 individus ont été trouvés positifs au schistosome, cependant ces individus furent considérés comme de faux positifs après un second test sérologique négatif, et compte tenu de la distribution spatiale de ces quelques individus, trop éparse par rapport au type de distribution classiquement retrouvée pour *S. bovis* (*i.e.* focalisée sur une même région ; Oleaga, Ramajo-Hernandez, Perez-Sanchez, and Ramajo-Martin, 2004). Bien que ce test sérologique basé sur la détection d'antigène de *S. bovis* ait déjà fonctionné pour le diagnostic de *S. haematobium* chez l'Homme (Roffi & Lemasson, 1981), il est également possible que ce dernier soit limité pour le diagnostic de souches hybrides de schistosomes, et donc que des animaux domestiques soient effectivement infectés par le parasite.

En ce qui concerne les rongeurs, les expériences menées en laboratoire sur *Rattus norvegicus* et les prospections réalisées sur *R. rattus* en milieu naturel ont démontré que les rats peuvent être infectés par la souche hybride de *S. haematobium* établie en Corse. Toutefois, une étude ancienne a montré que dans ces hôtes, *S. haematobium* produit des œufs non viables chez *R. rattus* (Martins, 1958) ce qui suggère que c'est la nature hybride de la souche de parasite qui permet à la lignée établie en Corse d'infecter ces hôtes. En Corse, deux rats sur les 34 rats piégés dans le Cavu ont été trouvés positifs à *S. haematobium* lors de la campagne de piégeage. L'un des rats était infecté par un unique vers mâle non mature et présentait des traces de présence actuelle ou antérieure d'œufs de parasite. Le second ne présentait que des traces d'hémozoïne spécifique des vers parasites hématophages (*i.e.* produit de digestion du sang par le parasite). Cette prévalence de 5,88% est relativement faible comparée à celle retrouvée dans les populations de rongeurs au Sénégal (*i.e.* jusqu'à 28,6% ; Catalano et al., 2018) ou dans le bétail au Bénin (*i.e.* environ 25% ; Savassi et al., 2020), mais beaucoup plus élevée que la prévalence dans les populations humaines (Boissier et al., 2016). Compte tenu de la faible permissivité des rats reportée dans la littérature, de la faible intensité parasitaire reportée chez les individus infectés et du faible nombre de rongeurs sur le pourtour du Cavu, le rôle des rats et plus généralement le rôle d'hôtes réservoirs dans la persistance de *S. haematobium* en Corse semble de fait relativement négligeable d'après nos connaissances actuelles.

RESEARCH ARTICLE

# Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission?

Ana Oleaga<sup>1</sup>, Olivier Rey<sup>2</sup>, Bruno Polack<sup>3</sup>, Sébastien Grech-Angelini<sup>4</sup>, Yann Quilichini<sup>5</sup>, Ricardo Pérez-Sánchez<sup>1</sup>, Pascal Boireau<sup>6</sup>, Stephen Mulero<sup>2</sup>, Aimé Brunet<sup>5</sup>, Anne Rognon<sup>2</sup>, Isabelle Vallée<sup>6</sup>, Julien Kincaid-Smith<sup>2</sup>, Jean-François Allienne<sup>2</sup>, Jérôme Boissier<sup>2\*</sup>



**1** Parasitology Laboratory, Institute of Natural Resources and Agrobiology (IRNASA, CSIC). Cordel de Merinas, Salamanca, Spain, **2** IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, Perpignan France, **3** UMR BIPAR, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES, INRA, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France, **4** Groupement Technique Vétérinaire de Corse, Ghisonaccia, France, **5** UMR SPE 6134, CNRS-Université de Corse Campus Grimaldi Bât 018, Université de Corse, Corte, France, **6** UMR BIPAR, Anses, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INRA, University Paris-Est, Animal Health Laboratory, Maisons-Alfort, France

\* [boissier@univ-perp.fr](mailto:boissier@univ-perp.fr)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Oleaga A, Rey O, Polack B, Grech-Angelini S, Quilichini Y, Pérez-Sánchez R, et al. (2019) Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission? PLoS Negl Trop Dis 13(6): e0007543. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007543>

**Editor:** Joanne P. Webster, Imperial College London, UNITED KINGDOM

**Received:** February 7, 2019

**Accepted:** June 11, 2019

**Published:** June 24, 2019

**Copyright:** © 2019 Oleaga 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:** The sequences are available on Genbank database (accession numbers: MK797747 and MK797748).

**Funding:** JB received a grant from the ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) (<https://www.anses.fr/fr>). This study is set within the framework of the "Laboratoire d'Excellence (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41). The funders had no role in study design, data collection and

## Abstract

Environmental and anthropogenic changes are expected to promote emergence and spread of pathogens worldwide. Since 2013, human urogenital schistosomiasis is established in Corsica island (France). Schistosomiasis is a parasitic disease affecting both humans and animals. The parasite involved in the Corsican outbreak is a hybrid form between *Schistosoma haematobium*, a human parasite, and *Schistosoma bovis*, a livestock parasite. *S. bovis* has been detected in Corsican livestock few decades ago raising the questions whether hybridization occurred in Corsica and if animals could behave as a reservoir for the recently established parasite lineage. The latter hypothesis has huge epidemiological outcomes since the emergence of a zoonotic lineage of schistosomes would be considerably harder to control and eradicate the disease locally and definitively needs to be verified. In this study we combined a sero-epidemiological survey on ruminants and a rodent trapping campaign to check whether schistosomes could shift on vertebrate hosts other than humans. A total of 3,519 domesticated animals (1,147 cattle; 671 goats and 1,701 sheep) from 160 farms established in 14 municipalities were sampled. From these 3,519 screened animals, 17 were found to be serologically positive but were ultimately considered as false positive after complementary analyses. Additionally, our 7-day extensive rodent trapping (i.e. 1,949 traps placed) resulted in the capture of a total of 34 rats (*Rattus rattus*) and 4 mice (*Mus musculus*). Despite the low number of rodents captured, molecular diagnostic tests showed that two of them have been found to be infected by schistosomes. Given the low abundance of rodents and the low parasitic prevalence and intensity among rodents, it is unlikely that neither rats nor ruminants play a significant role in the maintenance of schistosomiasis outbreak in Corsica. Finally, the most likely hypothesis is that local people initially

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

infected in 2013 re-contaminated the river during subsequent summers, however we cannot definitively rule out the possibility of an animal species acting as reservoir host.

## Author summary

There is an increasing interest on the effect of global changes on the transmission of infectious diseases. Both environmental and anthropogenic changes are expected to promote outbreaks and spread of pathogens. In particular, tropical infectious diseases are expected to move towards more temperate latitudes. Until 2013, urogenital schistosomiasis was restricted to tropical and sub-tropical areas. In summer 2013, a schistosomiasis outbreak has emerged in Corsica (France) with more than 100 cases. Corsica is a French Mediterranean island, which is very popular for tourists from throughout Europe due to the natural beauty of the environment. Surprisingly, in summer 2015 and 2016, the contamination has resumed, and schistosomiasis has been classified in the list of French notifiable infectious disease. In this context it has been hypothesised that reservoir vertebrate hosts, either human and/or animal are at the origin of the maintenance of the local transmission. This paper shows that ruminants (cow, sheep and goats) should not play a role of reservoir host but we found that rodents living in the vicinity of the transmission sites have been infected by the parasite. Considering the low abundance of rodents and the low parasitic prevalence/intensity among rodents, it is unlikely that rats play a significant role in the maintenance of schistosomiasis outbreak in Corsica and that other animals or human could maintain the parasite locally.

## Introduction

The increasing movements of humans and animals and the ongoing climate changes at the global scale are expected to promote the emergence or the spread of tropical infectious diseases in temperate areas [1]. In this context, in summer 2013 more than 100 cases of human urogenital schistosomiasis were contracted in a very confined locality in the south of Europe (Corsica, France) [2, 3]. In summer 2014 the incriminated river (i.e. the Cava) was closed to recreational activities, but during the two next summers, 2015 and 2016, new local contamination events occurred [4, 5]. Molecular analyses performed on parasites from patients infected in 2013 and 2016 revealed that the parasite was the same unique strain [4]. In this scenario, it has been hypothesised that vertebrate hosts, either human, animal or both, would have been the original source and ongoing reservoirs for this parasite strain, maintaining the parasite transmission in this area [4].

Schistosomes are trematode parasites affecting either humans, animals or both, according to the species concerned in tropical and sub-tropical countries [6]. *Schistosoma haematobium* is responsible for human urogenital schistosomiasis, it is widely distributed through sub-Saharan Africa, Egypt, Sudan and the Arabian Peninsula and it is estimated to affect more than 110 million people [7]. *Schistosoma bovis* is a schistosome species infecting livestock (cattle, sheep, goats, pigs, equines, and dromedaries), wild ruminants, and rodents [8]. This parasite species is widely distributed throughout Africa, the Middle East and to a lower extent in the Mediterranean islands and Spain [9]. It is estimated that at least 165 million cattle are infected with schistosomes worldwide causing serious socio-economic damages [10]. Considering the One



Health approach, it has recently been proposed to better quantify these economic losses and eventually to treat the schistosomes infected livestock [11].

Surprisingly, the parasite that emerged in Corsica was not a pure *S. haematobium* parasite but a hybrid between *S. haematobium* and *S. bovis* [12]. It has previously been showed that this hybrid was imported from Senegal [2]. *S. haematobium* x *S. bovis* hybrids have also been reported in Niger, Mali and Benin [13]. Previous studies have found these hybrid parasites in human and rodent hosts [8]. Only two studies have investigated the presence of such hybrid parasites in domestic cattle but did not find any [14, 15]. However, as the own authors recognised, they only searched the blood vessels of the intestinal tract (infection site of pure *S. bovis*) and not the vessels of the urinary tract (infection site of pure *S. haematobium*), where the hybrids may have passed unnoticed [14, 15]. The fact that *S. bovis* was historically known to be present in the Corsican island [16, 17] makes the epidemiological situation much more complex and suggests the likely presence of local reservoir hosts and the potential of local hybridization events. The last study on the presence of *S. bovis* dates from 1962 [18] and since that time, *S. bovis* has not been investigated. Identifying infected animals in slaughterhouses relies on the detection of worms of approximately 1.5 cm in the cattle mesenteric system. Moreover, clinical manifestations in the *S. bovis* infected animals are poorly documented and the disease is mainly sub-clinical and chronic. As a consequence, the presence of *S. bovis* in the island is enigmatic and need to be investigated [19].

Another concern is the potential presence of rodent reservoir hosts. It is well known that schistosome parasites have affinity for rodent hosts, as evidenced by the fact that most species of schistosomes can be maintained under laboratory conditions using several rodent species as vertebrate hosts (e.g. mouse, hamster, rat, gerbil or guinea pig). There is experimental evidence that *S. bovis* can infect the Nile rat (*Arvicanthis niloticus* [20]) and a wide range of wild rodents has been found to be naturally infected by this parasite [21]: *Arvicanthis niloticus* [8, 20], *Mastomys natalensis* [22], *Praomys albipes*, *Rattus rattus*, *Mastomys coucha* and *Lophuromys flavopunctatus* [23]. However, rodents are poorly compatible for *S. haematobium* and only *Mastomys coucha* and *Arvicanthis niloticus* were successfully experimentally infected so far [23]. To our knowledge there is no evidence of natural *S. haematobium* rodent infection. Interestingly however, one *S. haematobium* x *S. bovis* hybrid parasite were recently detected in *Mastomys huberti* in Senegal [8]. The close genetic similarities between parasites established in Corsica and those present in Senegal hence raise the question whether rodents present in Corsica could constitute potential reservoir hosts locally.

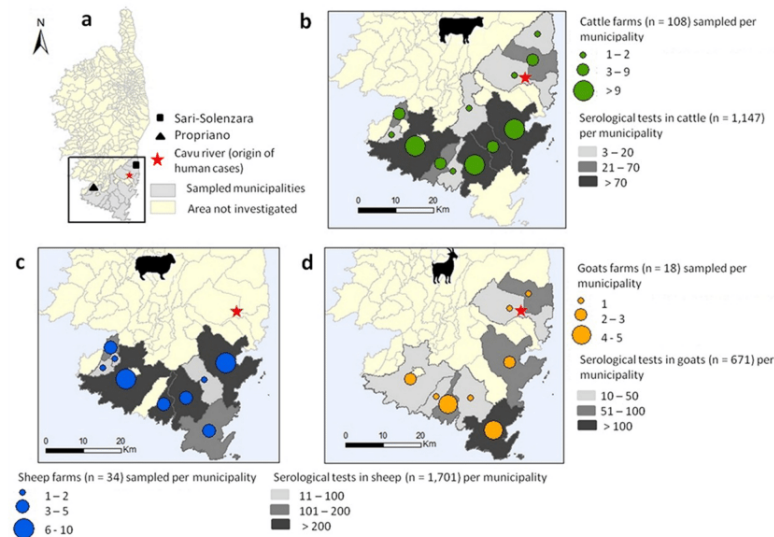
Our aim was to identify if animals (livestock and/or wild rodents) can be reservoir host of zoonotic schistosomes in Corsica. This study included both a large-scale sero-epidemiological survey on ruminants and a rodent trapping campaign in the vicinity of the Cavu where the schistosomiasis transmission is still persisting. We have also experimentally tested the ability of schistosome hybrids from Corsica to infect *Rattus norvegicus* laboratory hosts.

## Methods

### Sero-epidemiological survey of ruminants

**Sampling area and serum collection.** Corsica is a French island situated in the north-western Mediterranean Sea at 15 km north from Sardinia and 90 km west from Tuscany in Italy. A large part of the island is preserved as a nature reserve (3500 km<sup>2</sup>), with a mountainous landscape. About 320,000 people live in Corsica. Besides tourism, the local leading economic activity, livestock farming also represents an important resource with approximately 113,000 sheep, 46,000 goats, 55,000 pigs and 65,000 cattle recorded at the island scale [24]. Animals were sampled in an area southwards of a virtual line joining Propriano to Solenzara





**Fig 1.** Mapping of the sampling area in south Corsica (a) and distribution of the sampled cows (b), sheep (c) and goats (d). This map was made using QGIS 3.4.1 using open shapefile map of the Corsica island.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007543.g001>

municipalities that includes (i) the historical *S. bovis* foci near the municipalities of Propriano and Sartène [18] and Monacia-d'Aullène [16] and (ii) the Cavu where human contaminations first occurred in 2013 and 2015 (Fig 1). Blood samples were collected by practicing veterinarians in 2014 and 2015, during the annual serological testing of herds for brucellosis surveillance. In this area, about 16,200 adults' ruminants (7,500 cattle, 7,300 sheep and 1,400 goats) are reared in 255 farms (165 for cattle, 59 for sheep and 31 for goats) localized in 24 municipalities [24].

## ELISA assay

ELISA tests were performed to detect potential anti-schistosome antibodies in the sera of animals using a tegumental extract (TG) of *S. bovis* adult worms as coating antigen. This *S. bovis* TG extract was obtained as previously described [25].

Multi-well polystyrene plates (Corning, Ref 3369) were coated overnight at 4°C with 0.5 µg/well of TG extract in 100 µl of carbonate buffer, pH 9.6. The following day, the plates were first washed three times with 0.05% Tween-20 in PBS (TPBS) and then blocked with 200 µl/well of 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at 37°C. After a series of three additional washes, the sera were placed into duplicated wells (100 µl/well of a 1/100 dilution in TPBS) and incubated for 1 hour at 37°C. After a last washing step, 100 µl/well of a 1/16,000 dilution of peroxidase-labelled anti-bovine IgG (Sigma, A5295) or a 1/6,000 dilution of peroxidase-labelled anti-Sheep/Goat IgG (AbD Serotec, STAR88P) was added and the plates were incubated for 1 hour at 37°C. Finally, the plates were incubated for 10 minutes at room temperature with 100 µl/well of substrate solution (0.6 mg/ml of orto-phenylenediamine and 0.4 µl/ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrate buffer pH 5.0). The reaction was stopped with 100 µl/well of 3N sulfuric acid, and the optical densities (OD) at 492 nm were read with the Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Scientific).

In each plate, 3 positive and 3 negative control sera were included. The negative and positive control sera used for the analysis of sheep and goats were obtained from naive sheep and from sheep experimentally infected with *S. bovis*. For the analysis of the bovine sera, positive

and negative control sera were collected from cattle during an epidemiological study performed in the province of Salamanca (Spain) [26]. Any positive and/or doubtful sera potentially detected were reanalyzed independently following the same protocol. Additionally, bearing in mind that the trematode *Fasciola hepatica* is also present in Corsica [27], the potential reactivity of the TG extract with antibodies against *F. hepatica* infection was checked. To do so, serum samples from six lambs experimentally infected with 100 *F. hepatica* metacercariae obtained in a previous work [28] were analyzed by ELISA against the excreted/secreted antigen of *F. hepatica* (E/S Fh) and the TG extract of *S. bovis*. The E/S Fh antigen was prepared as previously described [29].

### Statistics of ELISA data

To analyze the results of the serology and to compare serological patterns between samples, each optical density (OD) was transformed into an Elisa Index (EI) by applying the following formula: OD of each serum / mean OD of the negative control sera included in each plate. Receiver–Operator Characteristic (ROC) curve were built for the TG extract and used to establish the cut-off value of EI used to discriminate between positive and negative animals. A ROC curve is obtained by calculating the sensitivity and specificity of a test or an antigen at every possible cut-off point, and plotting sensitivity against specificity [30]. The current ROC analysis was performed using 50 well-defined sera from sheep infected experimentally with *S. bovis* and 164 sera from naive sheep (without schistosomes). After that, the cut-off selected was the EI value that gave the highest diagnostic performance for the TG extract, which was calculated as the sum of the sensitivity and specificity divided by two. Then, this value was used to establish the positive/negative state of all the animal sera analysed. This ROC analysis was performed using the SPSS v17 software package.

### Coprological methods

For ELISA positive animals, coprological examination was assessed by recovering faecal sample directly from the rectum. A faecal sample of approximately 100 grams was diluted in saline solution and passed through a series of stainless steel sieves (420 µm, 250 µm, and 45 µm). The eggs should be retained in the last sieve.

### Rodent trapping

The trapping campaign was done along the Cavu between the 29<sup>th</sup> of May and the 9<sup>th</sup> of June 2018. The distance between the river and the traps was generally less than 50 meters and never greater than 150 meters. We have focused our survey in the vicinity of the human transmission sites identified in 2013 and 2015 [2, 4]. The traps (27x9x9 cm; Caussade, France) were deposited along the forest in steep locations and also near human activities. Our protocol considered the nocturnal activity of the targeted species. Thus the traps were baited every late afternoon, and inspected in subsequent early morning. A total of 1,949 traps were placed during 10 trapping sessions. Nontarget species such as shrews (*Crocidura suaveolens*), hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) or weasels (*Mustela nivalis*) were immediately released at the point of capture.

Trapped small rodents (mouse and rats) were returned alive to the laboratory for necropsy. Animal were euthanized with lethal injection of 1 mg per kg body weight of a sodium pentobarbital solution (Dolethal, Vetoquinol, Lure, France) and then perfused using an hepatic perfusion technique [31]. The resulting collected blood was filtered to recover potential adult worms. Animal internal organs (i.e. liver, mesenteric vessels, peri-vesical area) were examined to identify possible traces of schistosome infection. Some suspicious zones such as liver cysts

and abnormal (hemozoin-like) pigments were biopsied and the fragments of tissues were stored in ethanol 95% for subsequent genetic diagnostics.

DNA extraction from worms and biopsies were performed using E.Z.N.A. tissue DNA extraction kit (Omega Bio-tek, USA) following the manufacturer's instruction. Extracted DNA from worms and biopsies were then amplified by PCR using Sh73/DraI assay [32]. This PCR diagnostic tool is very sensitive and specific to the *S. haematobium* parasite group and the resulting genetic profiles allow distinguishing between *S. bovis* and *S. haematobium* [32]. The PCR target a 121 bp repeated sequence of the schistosome genome. According to the PCR efficiency some extra bands can be observed representing multiples of 121 bp (e.g. 242). For worms only, the complete internal transcribed spacer (ITS) and a partial region of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene were amplified by PCR and sequenced by a subcontractor (Genoscreen, Lille, France). Sequences were first visualised and manually corrected before being compared to a set of reference sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database including the sequences corresponding to the parasites from the 2013 and 2015 outbreaks [2, 4]. Detailed PCR protocols are available in [S1 Text](#).

### Testing experimental infection of hybrid schistosomes from Corsica on *Rattus norvegicus*

The parasite that emerged in Corsica is routinely maintained in the lab using hamsters as vertebrate hosts and a sympatric lineage of *Bulinus truncatus* as intermediate host [33]. Three Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were exposed to three different doses of cercariae: 400, 600 and 800 following standard procedure [31, 34]. Rats were returned to their facilities and reared under standard experimental conditions for 105 day to give time for the potential infecting parasites to develop in their hosts. After this developing period, the rats were euthanized with lethal injection of 0.3 ml of a sodium pentobarbital solution (Dolethal, Vetoquinol, Lure, France) and perfused using hepatic perfusion technique [31]. The blood from each rat was filtered and visually inspected for the presence of adult worms. Similarly to wild animals, organs were also thoroughly examined to identify possible traces of schistosome infection.

### Ethics statement

All experiments were carried out according to national ethical standards (NOR: AGRG1238753A). The French Ministry of Agriculture (Ministère chargé de l'Agriculture), and the French Ministry for Higher Education, Research and Technology (Ministère de l'Éducation 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 (Decret n° 87–848 du 19 Octobre 1987).

## Results

### Sero-epidemiological survey on ruminants

The sera of a total of 3,519 animals from 160 farms localized in 14 municipalities were sampled. This sampling effort represents 15% (n = 1,147), 48% (n = 671) and 22% (n = 1,701) of the total cattle, goats and sheep reared in this area respectively (Fig 1). The resulting sera were stored at -20°C and sent to the laboratory of parasitology at IRNASA (CSIC) in Salamanca (Spain) for ELISA tests.



ROC analysis allowed us to set up a positivity/negativity cut-off between EI 2.5 and 2.8, with a diagnostic performance of 96.7% (97% sensitivity and 99.4% specificity). Since farmed animals are expected to be in contact with a greater number of pathogens and parasites compared to the experimental animals infected under laboratory conditions, we conservatively established a cut-off slightly higher (namely, EI 3). Accordingly, EI values comprised between 2.5 and 3 were considered unclear results and the associated sera were re-analysed. More generally, we applied the following criterion: animals with serum samples displaying EI < 2.5 were considered as negative, those with sera that displayed EI values between 2.5 and 3 were considered as doubtful, and finally animals with a detected EI value > 3 were considered as infected by Schistosomes.

Table 1 shows the overall results of the ELISA analyses of 3,519 sera and Fig 2 represents the frequency of EI values obtained for each host species (i.e. goat, cattle, sheep). These results indicate that 99% of the sera analysed were negative, 0.52% remained doubtful after a double-analysis and 0.48% were found to be positive with EI values higher than 3. In order to explain these positive reactions, we first analyzed the cross-reaction to *F. hepatica*, which is an autochthonous trematode in Corsica [27]. The sera from sheep infected with *F. hepatica* showed increasingly detectable levels of antibodies to *F. hepatica* from the second week of infection onwards. However, none of these sera reacted at all with the TG antigen, clearly indicating that a possible concurrent infection by *F. hepatica* would not interfere in the *S. bovis*-ELISA diagnostic test. To confirm the diagnosed positive cases, additional blood samples from some animals found to be seropositive were collected and analyzed independently. From the 17 animals (12 cows– 1 sheep– 4 goats) detected positives during the first serological screening some animals was declared dead by the breeders (1 sheep– 1 goat– 1 cow) and for 8 animals (3 goats and 5 cows), the breeders refused a second serological sampling. Only 6 cows were serologically tested a second time. These cows were also diagnosed based on coprological examinations. This additional series of diagnostic tests revealed that these six cows were in fact negative based on both serological and coprological (i.e. absence of schistosome eggs) examinations.

## Rodent trapping

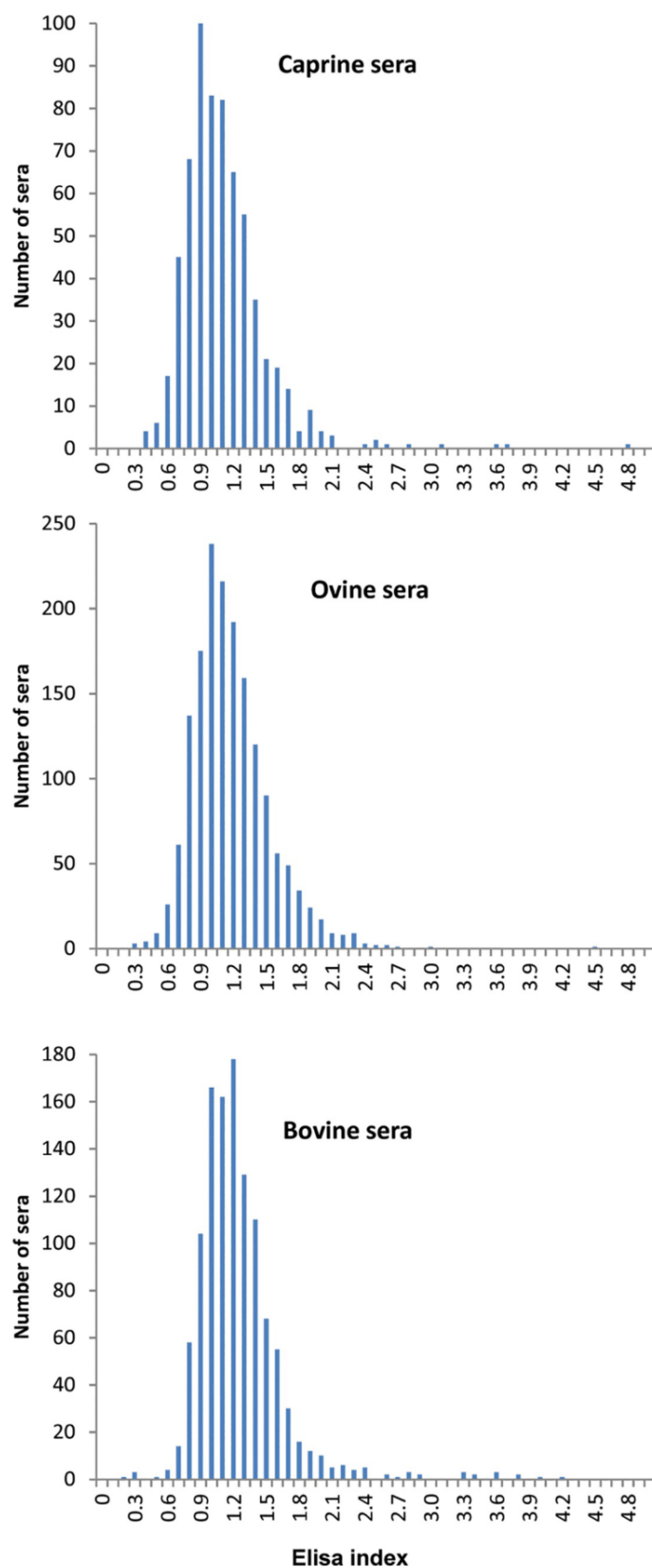
The Table 2 represents the GPS coordinates of the different sites and the number of traps by site. Out of the 1,949 traps placed in the field, a total of 34 rats (*Rattus rattus*), 4 mice (*Mus musculus*), 2 shrews (*Crocidura suaveolens*), 3 hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and 2 weasels (*Mustela nivalis*) were trapped.

No trace of schistosome was found in the mice (*Mus musculus*). Among the 34 rats, one individual (called R1) was infected by a unique male schistosome. This rat also displayed granuloma on the liver (that could indicate the past or present occurrence of schistosome eggs in the liver) and black pigments on the mesenteric system. These pigments were similar to the hemozoin pigment specifically found in mature female schistosomes. Both granuloma and a piece of the mesenteric vein harbouring the black pigment were biopsied. A second rat (R2)

**Table 1. Results of the Elisa diagnostic based on the Elisa index (EI) values obtained on individual sera from goats, sheep and cows.**

|       | Negative<br>EI < 2.5 | Unclear<br>EI = 2.5–3 | Positive<br>EI > 3 | Total |
|-------|----------------------|-----------------------|--------------------|-------|
| Goat  | 663                  | 4                     | 4                  | 671   |
| Sheep | 1694                 | 6                     | 1                  | 1701  |
| Cow   | 1127                 | 8                     | 12                 | 1147  |

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007543.t001>



**Fig 2. Occurrence of the ELISA index (EI) values given by the analyzed sera samples in goats, cows and sheep.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007543.g002>

did not display adult worms after the perfusion but some black pigmentation on the mesenteric system and on the hepatic portal system similar to those found in the rat R1. Biopsies were performed on these two zones. Additionally, samples from the liver, the mesenteric vessels and the bladder from a third rat (R3) where no trace was observed were also biopsied as negative controls.

Fig 3 shows PCR profiles after the Sh73/DraI PCR diagnostic test performed on the biopsies from the two suspicious rats (R1, R2) and the negative non-infected rat R3. No band amplification was observed on the biopsies from the non-infected rat R3 (well 1, 2, 3). Conversely, a PCR amplification was obtained for the adult worm and all biopsies collected on the rat R1 (well 4: worm; well 5: biopsy of mesenters; well 6: biopsy of the granuloma) and all amplifications displayed a migration pattern specific to pure *S. haematobium* (well 12). In respect with the rat R2, we find less intense but positive PCR signal (i.e. presence of the 121 bp diagnostic band) on the mesenteric biopsy (well 8). No amplification was obtained on the biopsy performed on the hepatic portal system of the same rat (well 9).

The ITS sequence (Genbank accession number: MK797748) from the single worm from the rat R1 was assigned to *S. haematobium* and the cox1 sequence was assigned to *S. bovis*, a pattern commonly found in hybrids from the lineage established in Corsica. The cox1 sequence (Genbank accession number: MK797748) obtained from this worm is strictly identical to the Sb2 haplotype found during the 2013 and 2015 outbreaks [2, 4].

## Experimental rodent infection

Among the three Wistar rats experimentally exposed to the schistosome strain that emerged in Corsica only two were slightly infected. No worms were recovered from the rat exposed to 800 cercariae and no trace of schistosomes was observed in the organs. The rat exposed to 600 cercariae displayed one schistosome pair, two single males and a few granulomas on the liver. Finally, the rat exposed to 400 cercariae displayed a single male worm and no granuloma in the liver. No pigment trace was observed on the three animals.

## Discussion

In 2013, the emergence of schistosomiasis in Corsica was clearly unexpected for both the scientific community and public health authorities [35]. Even more surprising was the persistence of the outbreak with evidences of new local infections during summer 2015 and 2016 [4, 36]. Because free larval stages cannot resist in the environment, the persistence of the parasite has to be attributed to the maintenance inside intermediate and/or definitive hosts. Considering the longevity of infected snail intermediate hosts in the lab (170 days at best [37]) and if we

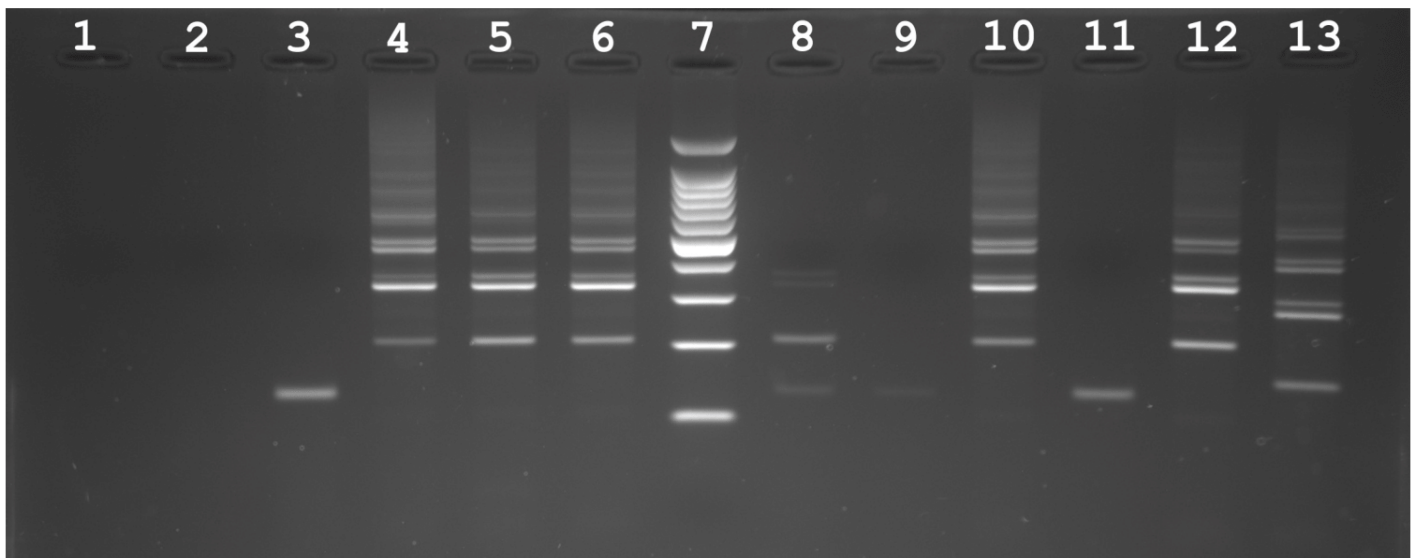
**Table 2. Name, GPS coordinates and number of traps for each site.**

| Site name               | Coordinates                | Number of traps | Number of trapped animals ( <i>Rattus rattus</i> ) |
|-------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------------------------------|
| Les trois piscines*     | 41°43'56.66"N 9°17'38.11"E | 786             | 6 (5)                                              |
| Le parc accrobranche*   | 41°43'26.86"N 9°17'55.09"E | 731             | 24 (15)                                            |
| Le pont de Conca*       | 41°42'23.15"N 9°20'0.65"E  | 298             | 8 (7)                                              |
| L'école de Tagliu Rossu | 41°42'28.81"N 9°19'3.78"E  | 80              | 5 (5)                                              |
| La prise d'eau          | 41°42'52.99"N 9°18'14.68"E | 54              | 2 (2)                                              |

\*: evidence of local human contamination during summer 2013 and 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007543.t002>





**Fig 3. Molecular diagnostic of samples (either worms or biopsies) recovered from non-infected (negative control) and infected rats (*Rattus rattus*) in Corsica, France.** The Sh73/DraI PCR specifically targets parasites from the *S. haematobium* group. The first three wells correspond to PCR results obtained for biopsies from the liver (well 1), mesenteric vessels (well 2) and bladder (well 3) of a non-infected rat (R3). The following three wells correspond to PCR results obtained from an adult worm (well 4), a mesenteric biopsy (well 5) and a biopsy on a liver granulum (well 6) from the infected rat R1. Well 7 is a size standard (ladder). Well 8–9 are PCR amplifications obtained from a biopsies of the mesenteric vessels (well 8) and of the hepatic portal system (well 9) collected on the infected rat R2. Well 11: negative control. Well 10, 12 and 13 are positive controls (well 10: worm of the corsican schistosome strain, well 12: DNA from pure *S. haematobium* worm and well 13: DNA from pure *S. bovis* worm). Note that all of the amplification patterns obtained on the infected rats display a classical *S. haematobium* pattern.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007543.g003>

suppose that these snails can resist over one winter season this cannot explain the 2015 and 2016 cases. The existence of local vertebrate reservoir hosts either human and/or animal is the more likely explanation.

The diagnostic of schistosomiasis in humans or animals is far from being trivial. For humans, several diagnostic commercial kits exist based on the ELISA, Indirect Haemagglutination (IHA) or Western Blot methods [38]. During the outbreak in Corsica, the French authorities for human health recommended the concurrent use of these two methods (IHA and ELISA), followed by a Western Blot analysis when the two former tests were discordant. For animals, no such commercial kits exist to detect bovine schistosomiasis. Infections of ruminants by *S. bovis* can be assessed either directly, i.e. through the detection of parasite eggs in faeces or adult worms in the mesenteric veins in sacrificed animals, or indirectly by detecting antibodies specific to *S. bovis* in animals' blood serum. Coprological diagnosis, which is the most frequently used by veterinarians, has high specificity but is very laborious and offers low sensitivity [39]. The detection of specific antibodies to *S. bovis* antigens in the animal host is more sensitive than coprology and furthermore, the serodiagnostic methods (as ELISA) can be applied to large-scale epidemiological studies [40].

In this study, we performed a wide serological survey in domestic ruminants originating from the geographic area where human infections by schistosomes were first reported in south Corsica. We used the *S. bovis* TG extract as antigen, which has proved to be very efficient and reliable for the detection of antibodies of *S. bovis* in sheep [41]. This method allowed us to detect a total of 17 positive animals. However, for several reasons we believe these positively diagnosed animals were in fact false positives. First, cows found to be serologically positive after the first set of analyses were found to be negative after a second batch ELISA analyses and a sub-sample of these animals were found to be negative using coprological test. Second, *S.*

*bovis* usually exhibits a focalized distribution and infected animals are expected to cluster into few particular farms [42]. Contrary to this expectation, the 17 positively diagnosed animals originated from 10 different farms sometimes geographically distant from one another. Third, despite our first technical validation, glycan antigens can be responsible for many cross-reactions between parasite infections [26, 43]. We thus believe that the positive diagnostic of these 17 sera result from unspecific reactions to the glycoproteins that contain the TG extract [41]. In this regard, the potential influence of the hybrid status of schistosomes on the efficiency of serological diagnostic is not known. The sensitivity of serological commercial tests using *S. mansoni* antigens is lower for *S. haematobium* infection than for *S. mansoni* infection [44]. *S. bovis* and *S. haematobium* are closely related species and *S. bovis* antigen has proved to be useful for the detection of human infections by *S. mansoni*, *S. intercalatum* and also *S. haematobium* [45–47]. However, the sensitivity of serological tests needs to be evaluated in the case of hybrid parasite infections in human.

Concerning rodents, both our experimental (i.e. on *R. norvegicus*) and field (on *R. rattus*) approaches indicate that rats are partially permissive to the hybrid schistosome strain that emerged in Corsica. Unfortunately, we did not experimentally test the compatibility of the schistosome strain naturally present in Corsica to black rats (*R. rattus*) since no laboratory strain of *R. rattus* was available. Importantly, both the black rats [48–50] and the brown rats [50] are known to be natural alternative reservoir hosts of the parasite *S. japonicum*. In the case of *S. mansoni* the situation is more complex. The two rodent host species are partially permissive to experimental infections. In particular, adult worms develop in the brown rat but the eggs produced are non fertile eggs and these eggs are not excreted, thus this species is not considered as a suitable vertebrate host for parasite transmission [51]. Conversely, the black rat is known to be a suitable host for *S. mansoni* transmission [52]. We lack information concerning the suitability of rats for either *S. haematobium* or *S. bovis*. Experimental infections showed that both rat species can be infected but are not very permissive to *S. haematobium* parasite [53]. To our knowledge only one study showed that *R. rattus* is permissive to *S. bovis* [23]. The ability of hybrid schistosomes to increase its host range and thus for *S. haematobium* hybrids to become a zoonotic parasite is a real concern. To date, no livestock animals was found to be infected by *S. haematobium* x *S. bovis* hybrid parasites [14] and only few rodents were found to be infected in Senegal [8]. In the case of Corsica, very few animals were caught (2.3% of trapping success) hence indicating a small abundance of rats in the vicinity of the identified transmission sites. Considering both the low parasite infectivity in experimental infection and the field observation showing low parasite prevalence and intensity in rodents (only two rats infected with very few worms and no trace of reproduction), we suppose that even if rats are permissive to infection their role in the maintenance and transmission of schistosomiasis locally is expected to be negligible.

In summary, our survey strongly suggests that bovine schistosomiasis is absent from the south of Corsica, and livestock or wild rodents may not play a role as reservoir host for human schistosomiasis. The host spectrums of schistosomes are at least partially known in their original distribution area in Africa, Asia and south America, but the invasion of a new ecosystem by a hybrid parasite strain may offer new host possibilities. As an example, the mouflon (*Ovis gmelini musimon*) is endemic from Corsica, and nothing is currently known about the ability of *S. bovis* to infect such Ovidae. The fact that *S. bovis* is known to infect sheep and the presence of a mouflon population in the Cavu valley could support this last hypothesis. Moreover, the hybrid status of the parasite makes the situation much more complex because the host spectrum of hybrid schistosomes remains enigmatic. Some positive patients emitting schistosome eggs could serve as reservoir for schistosome infection in Corsica. This hypothesis is likely because up to 66% of the patients that have been found to be infected so far were

asymptomatic [54], the diagnosis is difficult to establish and false negative are possible [54–56], and the median time for first symptom apparition is 30 weeks [54]. To conclude, even if the most likely hypothesis is that local people initially infected in 2013 re-contaminated the river during subsequent summers, we cannot definitively rule out the possibility of an animal species acting as reservoir host.

## Supporting information

**S1 Text. Primer sequences and PCR protocol.**  
(DOCX)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Pascal Boireau, Isabelle Vallée, Jérôme Boissier.

**Data curation:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Isabelle Vallée, Jérôme Boissier.

**Formal analysis:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Yann Quilichini, Jérôme Boissier.

**Funding acquisition:** Bruno Polack, Jérôme Boissier.

**Investigation:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Sébastien Grech-Angelini, Yann Quilichini, Stephen Mulero, Aimé Brunet, Anne Rognon, Isabelle Vallée, Julien Kincaid-Smith, Jean-François Allienne, Jérôme Boissier.

**Methodology:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Sébastien Grech-Angelini, Yann Quilichini, Jérôme Boissier.

**Project administration:** Jérôme Boissier.

**Supervision:** Jérôme Boissier.

**Validation:** Jérôme Boissier.

**Visualization:** Jérôme Boissier.

**Writing – original draft:** Ana Oleaga, Yann Quilichini, Jérôme Boissier.

**Writing – review & editing:** Ana Oleaga, Olivier Rey, Bruno Polack, Sébastien Grech-Angelini, Ricardo Pérez-Sánchez, Pascal Boireau, Isabelle Vallée, Julien Kincaid-Smith, Jérôme Boissier.

## References

1. Kim KH, Kabir E, Ara Jahan S. A review of the consequences of global climate change on human health. *Journal of environmental science and health*. 2014; 32(3):299–318. <https://doi.org/10.1080/10590501.2014.941279> PMID: 25226222.
2. 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 Infectious Disease*. 2016; 16:971–9.
3. Noel H, Ruello M, Maccary A, Pelat C, Sommen C, Boissier J, et al. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect*. 2017; 24:295–300. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.026> PMID: 28669843.
4. Ramalli L, Mulero S, Noel H, Chiappini JD, Vincent J, Barre-Cardi H, et al. Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in southern Corsica since 2013. *Euro Surveill*. 2018; 23(4):18–00017. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18–00017> PMID: 29382413; PubMed Central PMCID: PMC5801336.



5. Berry A, Paris L, Boissier J, Caumes E. Schistosomiasis Screening of Travelers to Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2016; 22(1):159.
6. ODARC, DRAAF. Chambre d'agriculture de la Corse. Chiffres clés de l'agriculture corse. [http://draafcorseagriculturegouvfr/IMG/pdf/Chiffres-cles\\_2018\\_cle8eadefpdf](http://draafcorseagriculturegouvfr/IMG/pdf/Chiffres-cles_2018_cle8eadefpdf). 2018.
7. Rollinson D, Simpson AJG. The biology of Schistosomes. From genes to latrines. London: Academic Press; 1987. 446 p.
8. 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(2):139–46. PMID: 12020886.
9. Catalano S, Sene M, Diouf ND, Fall CB, Borlase A, Leger 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; 218(3):429–33. Epub 2018/01/25. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy029> PMID: 29365139.
10. Mone H, Mouahid G, Morand S. The distribution of *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 in relation to intermediate host mollusc-parasite relationships. *Advances in parasitology*. 1999; 44:99–138. PMID: 10563396.
11. De Bont J, Vercruysse J. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitology today* (Personal ed. 1997; 13(7):255–62. PMID: 15275062.
12. Gower CM, Vince L, Webster JP. Should we be treating animal schistosomiasis in Africa? The need for a One Health economic evaluation of schistosomiasis control in people and their livestock. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017; 111(6):244–7. Epub 2017/10/19. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trx047> PMID: 29044372; PubMed Central PMCID: PMC5914355.
13. Mone H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsu-Nguema R, Ibikounle 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4643-4> PMID: 26268566.
14. Leger E, Webster JP. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology*. 2017; 144:65–80. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001190> PMID: 27572906.
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(4):e2110. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002110> PMID: 23593513.
16. Djuikwo-Teukeng F, Kouam Simo A, Allienne JF, Rey O, Njayeou Ngapagna A, Tchuem Tchente LA, et al. Population genetic structure of *Schistosoma bovis* in Cameroon *Parasites & vectors*. 2019; 12:56–67.
17. Brumpt E. Cycle évolutif complet de *Schistosoma bovis*. Infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bulinus contortus*. *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 1930; VIII:17–50.
18. Brumpt E. Cycle évolutif du *Schistosoma bovis* (*Bilharzia crassa*); infection spontanée de *Bulinus contortus* en Corse. *C R Acad Sci Ser III Sci Vie*. 1929; CLXXXI:879.
19. Grétilat S. Epidémiologie de certaines affections à trématodes des animaux domestiques en Corse (*Bilharziose bovine* et *distomatose bovine* et *ovine*). *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 1963; 38:471–81. PMID: 14074043
20. Calavas D, Martin PM. Schistosomiasis in cattle in Corsica, France. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(12):2163–4. <https://doi.org/10.3201/eid2012.141474> PMID: 25417654; PubMed Central PMCID: PMC4257831.
21. Ghandour AM, Babiker A. The in vivo development of *Schistosoma bovis* in the Nile rat. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978; 72(3):227–30. PMID: 666394.
22. Standley CJ, Dobson AP, Stothard JR. Out of Animals and Back Again: Schistosomiasis as a Zoonosis in Africa. 2012.
23. Hanelt B, Mwangi IN, Kinuthia JM, Maina GM, Agola LE, Mutuku MW, et al. Schistosomes of small mammals from the Lake Victoria Basin, Kenya: new species, familiar species, and implications for schistosomiasis control. *Parasitology*. 2010; 137(7):1109–18. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000041> PMID: 20380765.
24. Lo CT, Lemma A. Studies on *Schistosoma bovis* in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol*. 1975; 69(3):375–82. PMID: 808181.
25. Pérez-Sánchez R, Ramajo-Hernandez A, Ramajo-Martin V, Oleaga A. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics*. 2006; 6 Suppl 1:S226–36. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500420> PMID: 16511809.

26. Oleaga A, Ramajo V. Efficiency of the oral, intramuscular and subcutaneous routes for the experimental infection of hamster and sheep with *Schistosoma bovis*. Veterinary parasitology. 2004; 124(1–2):43–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.022> PMID: 15350660.
27. Valero MA, Panova M, Comes AM, Fons R, Mas-Coma S. Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. J Parasitol. 2002; 88(2):308–13. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0308:PISASO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0308:PISASO]2.0.CO;2) PMID: 12054003.
28. Martinez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, Lopez-Aban J, Ramajo V, Oleaga A, Manga-Gonzalez Y, et al. Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. Veterinary parasitology. 2004; 126(3):287–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.023> PMID: 15567592.
29. Casanueva R, Hillyer GV, Ramajo V, Oleaga A, Espinoza EY, Muro A. Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. J Parasitol. 2001; 87(3):697–700. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0697:IAFHIR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0697:IAFHIR]2.0.CO;2) PMID: 11426738.
30. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. Caspian J Intern Med. 2013; 4(2):627–35. Epub 2013/09/07. PMID: 24009950; PubMed Central PMCID: PMC3755824.
31. Dumont M, Moné H, Mouahid G, Idris MA, Shaban M, Boissier J. Influence of pattern of exposure, parasite genetic diversity and sex on the degree of protection against reinfection with *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 2007; 101:247–52. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0476-0> PMID: 17310396.
32. Abbasi I, Hamburger J, Kariuki C, Mungai PL, Muchiri EM, King CH. Differentiating *Schistosoma haematobium* from related animal schistosomes by PCR amplifying inter-repeat sequences flanking newly selected repeated sequences. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2012; 87(6):1059–64. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0243> PMID: 23109375.
33. 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. 2016; 10(11):e0005138. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005138> PMID: 27861520; PubMed Central PMCID: PMC5115654.
34. 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0943-1> PMID: 12910415
35. Kincaid-Smith J, Rey O, Toulza E, Berry A, Boissier J. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. Trends in parasitology. 2017; 33(8):600–9. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.009> PMID: 28539255.
36. 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. Euro Surveill. 2016; 21(1). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.1.30100> PMID: 26767427.
37. Chu KY, Sabbaghian H, Massoud J. Host-parasite relationship of *Bulinus truncatus* and *Schistosoma haematobium* in Iran. 2. Effect of exposure dosage of miracidia on the biology of the snail host and the development of the parasites. Bull World Health Organ. 1966; 34(1):121–30. PMID: 5295558
38. Hinz R, Schwarz NG, Hahn A, Frickmann H. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis—A review. Mol Cell Probes. 2016; 31:2–21. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.12.003> PMID: 27986555.
39. Gomes LI, Enk MJ, Rabello A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? Rev Soc Bras Med Trop. 2014; 47(1):3–11. Epub 2014/02/21. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0231-2013> PMID: 24553804.
40. 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. Veterinary parasitology. 2012; 190(3–4):530–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.023> PMID: 22785127.
41. Ramajo-Hernandez A, Oleaga A, Ramajo-Martin V, Perez-Sanchez R. Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. Veterinary parasitology. 2007; 144(1–2):45–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.034> PMID: 17055171.
42. Oleaga A, Ramajo-Hernández A, Pérez-Sánchez R, Ramajo-Martín V. Prevalence and distribution of the bullfighting cattle farms infected with *Schistosoma bovis* in the province of Salamanca (Spain). In: Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG, Valero MA (Eds), Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases Artes gráficas Aguilar SL, Valencia, pp 283–284. 2004.
43. Alarcon de Noya B, Colmenares C, Lanz H, Caracciolo MA, Losada S, Noya O. *Schistosoma mansoni*: immunodiagnosis is improved by sodium metaperiodate which reduces cross-reactivity due to glycosylated epitopes of soluble egg antigen. Exp Parasitol. 2000; 95(2):106–12. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4515> PMID: 10910711.

44. Kinkel HF, Dittrich S, Baumer B, Weitzel T. Evaluation of eight serological tests for diagnosis of imported schistosomiasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19(6):948–53. <https://doi.org/10.1128/CVI.05680-11> PMID: 22441394; PubMed Central PMCID: PMC3370443.
45. Belo S, Rompao S, Costa de Sousa B, Goncalves L, Ramajo V, Oleaga A, et al. Diagnostic potencial of IgG4/ELISA in schistosomiasis intercalatum infection. *Trop Med Int Health*. 2009; 14:193.
46. Roffi J, Lemasson JM. Use of a heterologous antigen (*Schistosoma bovis*) for the immunoenzymatic serodiagnosis of urinary bilharziasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1981; 74(5):532–45. PMID: 6976218.
47. Pardo J, Arellano JL, Lopez-Velez R, Carranza C, Cordero M, Muro A. Application of an ELISA test using *Schistosoma bovis* adult worm antigens in travellers and immigrants from a schistosomiasis endemic area and its correlation with clinical findings. *Scand J Infect Dis*. 2007; 39(5):435–40. <https://doi.org/10.1080/00365540601105806> PMID: 17464867.
48. Fedorko JM. *Schistosoma japonicum* in the black rat, *Rattus rattus mindanensis*, from Leyte, Philippines in relation to *Oncomelania* snail colonies with reference to other endoparasites. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999; 30(2):343–9. PMID: 10774707.
49. Kamiya H, Tada Y, Matsuda H, Tanaka H, Blas BL, Nosenas JS, et al. Annual fluctuation of *Schistosoma japonicum* infection in field rats, *Rattus rattus mindanensis*, in Dagami, Leyte, Philippines. *Jpn J Exp Med*. 1980; 50(5):375–82. PMID: 7206265.
50. Guo Y, Jiang M, Gu L, Qiao Y, Li W. Prevalence of *Schistosoma japonicum* in wild rodents in five islands of the West Dongting Lake, China. *J Parasitol*. 2013; 99(4):706–7. <https://doi.org/10.1645/12-35.1> PMID: 23259921.
51. Imbert-Establet D. Experimental approach of the role of *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* in the focus of *Schistosoma mansoni* of Guadeloupe. Comparative development of *S. mansoni* in 2 natural hosts (*R. rattus* and *R. norvegicus*) and 2 laboratory hosts (the white mouse and the white rat). *Annales de parasitologie humaine et comparee*. 1982; 57(3):271–84. PMID: 7137802.
52. Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology*. 2004; 129(Pt 5):571–85. PMID: 15552402.
53. Martins AV. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. *Bull World Health Organ*. 1958; 18(5–6):931–44. PMID: 13573118; PubMed Central PMCID: PMC2537966.
54. Noel H, Ruello M, Maccary A, Pelat C, Sommen C, Boissier J, et al. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.026> PMID: 28669843.
55. Mone H, Holtfreter MC, Mouahid G, Richter J. Difficulties in Schistosomiasis Assessment, Corsica, France. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22(4):762–5. <https://doi.org/10.3201/eid2204.160110> PMID: 26982685.
56. Berry A, Paris L, Boissier J, Caumes E. Schistosomiasis Screening of Travelers to Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2015.



Dans ce premier chapitre, nous avons démontré l'intérêt d'étudier à la fois les traits d'histoire de vie des parasites et ceux de leurs hôtes intermédiaires afin de mieux appréhender les risques d'émergence d'un parasite dans une nouvelle localité. Au travers de l'émergence de la bilharziose urogénitale en Corse, nous avons pu déterminer que la souche de *S. haematobium* établie localement, mais également les souches issues de zones tropicales d'endémie (*i.e.* l'Afrique), sont toutes résistantes aux températures hivernales locales des rivières Corse, mais qu'elles peuvent potentiellement survivre à des températures hivernales plus froides caractéristiques de zones géographiques de plus hautes latitudes d'Europe. Nous avons également démontré expérimentalement que toutes les souches de parasites testées sont capables de survivre dans leur hôte mollusque *B. truncatus* pendant une longue exposition au froid, et de reprendre leur cycle de vie après un retour à des températures optimales (Mulero et al., 2019). De plus, les populations de *B. truncatus* se sont révélées être également résistantes aux faibles températures, et localement adaptées aux conditions climatiques de leurs habitats respectifs (Mulero et al., 2019). Enfin, nous avons pu déterminer que la contribution d'un hôte vertébré autre que l'Homme dans la persistance locale de ce parasite est probablement négligeable compte tenu de la faible permissivité des rongeurs présents localement, de leur rareté, et de l'absence d'animaux domestiques positifs (Oleaga et al., 2019). Ces résultats suggèrent donc que la progression potentielle de la bilharziose urogénitale plus au nord de l'Europe dépend essentiellement de la présence de mollusques compatibles, de leur capacité à résister aux faibles températures (Mulero et al., 2019), et de l'activité humaine associée aux points d'eau, un scénario qui avec le réchauffement global actuel devient inquiétant (Kalinda et al., 2017). Dans un contexte épidémiologique, il est également crucial de prendre en compte les flux migratoires des populations humaines sous l'influence des changements globaux (Black et al., 2011) en particulier des populations en provenance des zones d'endémies de bilharzioses humaines (Panagiotopoulos, 2018). Enfin, ces résultats soulignent l'importance de mieux documenter la distribution spatiale des mollusques hôtes intermédiaires afin de mieux évaluer et prédire les risques d'émergence et d'identifier les sites compatibles avec une introduction future du parasite.

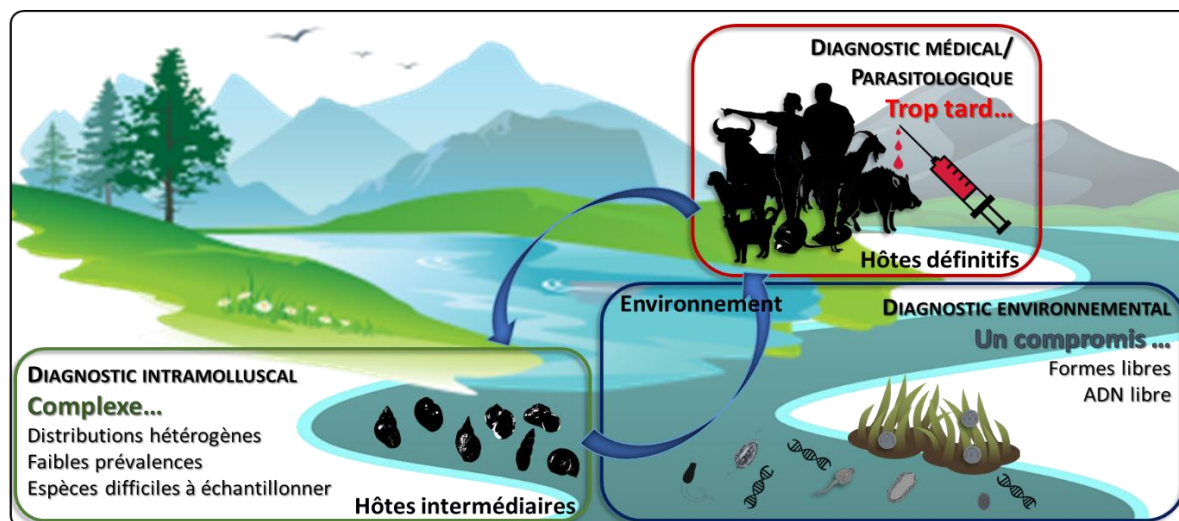
## CHAPITRE II : Développement d'outils de diagnostic ciblés pour contrôler l'évolution des maladies transmises par les mollusques d'eau douce dans l'environnement

---

Nous avons pu voir à travers le modèle de la bilharziose en quoi l'étude des traits d'histoire de vie des schistosomes et de leurs hôtes mollusques pouvait être informatif pour évaluer la capacité d'un parasite à émerger et persister dans une nouvelle localité. Cependant, le contrôle de ces événements d'émergence et plus généralement le suivi des foyers de transmission et des sites de transmission potentiels par l'étude de la circulation des trématodes, et des sites à risque d'émergence par l'étude de la distribution des hôtes mollusques, nécessite de disposer de données précises et actualisées sur les zones de présence de ces organismes dans le monde (Ellwanger, Kaminski, & Chies, 2019; Mulero et al., 2019). L'actualisation régulière de ces données de distribution est d'autant plus importante dans un contexte d'accélération de changements globaux (*e.g.* augmentation des températures, perturbation des précipitations et la fréquence accrue d'événements climatiques extrêmes ; Blum and Hotez, 2018), qui peuvent d'une part, rapidement perturber la distribution de ces organismes dans l'espace et le temps (Blum & Hotez, 2018), et d'autre part favoriser les zones de contact entre l'Homme et/ou les animaux domestiques et les pathogènes issus de la faune sauvage (Morand, 2011).

Les outils existants pour le suivi de ces parasitoses sont essentiellement focalisés sur des espèces ayant un fort impact en santé humaine et/ou animale (*i.e.* les bilharzioses et la fasciolose) et reposent essentiellement sur des diagnostics médicaux/vétérinaires dans les populations humaines et/ou sur les cheptels (Kincaid-Smith et al., 2017; Beesley et al., 2018). Ces diagnostics consistent essentiellement à détecter la présence d'œufs du parasite dans l'urine ou les fèces des hôtes vertébrés (Pontes et al., 2003; Brockwell et al., 2013), ou sur des approches sérologiques à partir d'échantillons d'urine, de fèces ou de sérum (Espinoza et al., 2007; Gomes et al., 2010; Brockwell et al., 2013). Bien qu'essentielles pour contrôler les effets néfastes de telles parasitoses, ces méthodes ne permettent pas d'anticiper la transmission du parasite, car si le parasite est détecté chez un patient ou un animal c'est qu'il est déjà présent, il est donc également impossible par ces approches d'anticiper un événement d'émergence.

Ces outils sont cependant utiles pour une identification des foyers de transmissions, **Figure 12.**



**Figure 12. Schématisation des trois stratégies de diagnostics applicables aux maladies transmises par les mollusques d'eau douce.** Encart rouge : Diagnostics médicaux sur les hôtes définitifs (e.g. sérologie, détection d'œufs du parasite dans les urines ou fèces). Encart vert : Diagnostic intramolluscal (i.e. identification du parasite dans son hôte mollusque par des approches de biologie moléculaires, d'émission de cercaires ou de dissection de mollusques). Encart bleu : Diagnostic environnemental, permettant la détection des formes libres du parasite (e.g. miracidia, cercaires et métacercaires) et de son ADN libre à partir de prélèvements d'eau ou de sédiments.

En ce qui concerne l'identification de sites à risque d'émergence, les données sur la répartition spatiale des mollusques d'eau douce datent pour certaines du XVIII<sup>e</sup> siècle (Welter-Schultes, 2012), ces données sont rarement mise à jours à large échelle en raison de la forte hétérogénéité spatiale et temporelle de ces espèces (Lamy, Pointier, Jarne, & David, 2012) et de la difficulté à en détecter certaines (Dubart, Pantel, Pointier, Jarne, & David, 2019). La mise à jour de ces données nécessiterait de nombreuses campagnes de prospection malacologique visuelle, donc beaucoup de main d'œuvre et des connaissances en malacologie pour l'identification des espèces (Kincaid-Smith et al., 2017). En ce qui concerne les foyers de transmissions et les sites à risque de transmission et avec les méthodes de suivis conventionnelles, la détection d'un trématode et de ses hôtes mollusques dans l'environnement peut se révéler coûteuse et complexe (Holmes et al., 2018), nous sommes donc encore loin de pouvoir évaluer le risque représenté par la bilharziose en Europe (Kincaid-Smith et al., 2017), et plus généralement le risque représenté par les trématodoses dans le monde. Pour d'autres modèles tel que les maladies transmises par les arthropodes, les

initiatives de suivis à large échelle sont plus avancées, car il existe déjà des réseaux d'études internationaux qui coordonnent les efforts pour le suivi de ces maladies et utilisent des outils de diagnostics moléculaires plus sensibles (ECDC, 2012), notamment les réseaux European Network for Arthropod Vector Surveillance for Human Public Health (VBORNET) ou Emerging and Vector-borne diseases (EVD) qui sont dédiés au suivi de maladies transmises par les arthropodes tels que la malaria, le chikungunya et la dengue à travers l'étude de la distribution spatiale des vecteurs arthropodes (ECDC, 2011; Schaffner et al., 2013).

En ce qui concerne l'étude de la circulation des trématodes et afin d'améliorer notre capacité de suivi de ces organismes, j'ai développé pendant ma thèse une série d'outils moléculaires, d'une part pour la détection de mollusques hôtes intermédiaires dans l'environnement aquatique, en particulier *B. truncatus* l'hôte intermédiaire de *S. haematobium* et *S. bovis*. Et d'autre part, pour la détection intramolluscale de trématodes, en particulier le parasite *S. haematobium* dans son hôte mollusque *B. truncatus*. À cette fin, le laboratoire naturel que constitue la Corse, siège d'un évènement récent d'émergence de bilharziose urogénitale, a été un excellent site pour tester nos outils en milieux naturels.

## **1. Détection de l'hôte mollusque dans son environnement pour l'identification de sites à risque d'émergence**

La dimension malacologique de ces maladies d'eau douce est un élément important à prendre en compte afin de développer des stratégies de contrôle efficaces dans un contexte d'émergence (Schniebs et al., 2017; Schniebs, Glöer, Quiñonero-Salgado, Lopez-Soriano, & Hundsdoerfer, 2018). Il est donc étonnant de constater que les données sur la répartition géographique des mollusques demeurent rares ou très anciennes (Welter-Schultes, 2012). Pour exemple, les dernières données sur la distribution de *B. truncatus* en Corse datent des années soixante (Doby et al., 1966b). À cette époque l'équipe ayant réalisé le suivi avait d'ailleurs statué sur le fait que la Corse rassemblait tous les éléments permettant l'émergence de bilharziose urogénitale localement (Doby et al., 1966a). Toutefois, la distribution locale de *B. truncatus* ne fut jamais réactualisée jusqu'à ce que cette maladie émerge en 2013 (Boissier et al., 2016). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce manque d'informations sur la distribution des mollusques d'eau douce.

Tout d'abord, en dépit de la biodiversité hébergée dans les écosystèmes d'eau douce (*i.e.* 10% de la biodiversité mondiale et 1/3 de toutes les espèces de vertébrés connues ; Janssen et al., 2016), ces écosystèmes ont historiquement reçu moins d'intérêt que les écosystèmes terrestres ou marins (Puth & Post, 2005; Collen et al., 2014). Ceci s'explique par la difficulté de suivre les espèces d'eau douce, ce qui se traduit également par un manque de résolution taxonomique à l'échelle globale (*i.e.* nous connaissons la répartition globale des grandes familles de gastéropodes, mais pas la distribution détaillée par espèces ; Lu et al., 2018) (Collen et al., 2014) ; la majorité des études réalisées dans ces environnements fragmentés étant généralement très localisés (Collen et al., 2014). Ensuite, la distribution des populations de mollusques d'eau douce est hautement hétérogène d'un point de vue spatial et temporel, ce qui rend leur suivi particulièrement complexe (Lamy et al., 2012). Enfin, comme évoquées précédemment, les méthodes de suivis classiquement employées (*i.e.* prospection visuelle) peuvent se révéler laborieuses et chronophages et nécessitent une expertise malacologique pour l'identification des espèces (Lamy et al., 2012). De plus, les espèces préférant des habitats difficilement accessibles à l'Homme peuvent nécessiter un effort d'échantillonnage accru (Mulero, Toulza, et al., 2020).

Ce contexte rend l'utilisation d'outils de diagnostics par ADNe ciblés particulièrement indiquée pour renforcer notre capacité de suivi de ces organismes (Kincaid-Smith et al., 2017). À cet égard, la littérature scientifique s'est récemment vue enrichie d'études proposant des outils de diagnostics par ADNe pour la détection de mollusques aquatiques, notamment pour des espèces invasives (*i.e.* *Potamopyrgus antipodarum*, *Crepidula fornicata* et *Physa acuta* ; Goldberg, Sepulveda, Ray, Baumgardt, and Waits, 2013; Clusa et al., 2017; Klymus, Marshall, and Stepien, 2017; Miralles, Parrondo, Hernandez de Rojas, Garcia-Vazquez, and Borrell, 2019). Des outils similaires ciblant des espèces de mollusques capables de transmettre des parasites à l'Homme et aux cheptels ont également été développées, notamment, *Oncomelania hupensis* un mollusque impliqué dans la transmission de la bilharziose sino-japonaise (Fornillos et al., 2019), *Galba truncatula*, impliqué dans la transmission de la fasciolose et de la paramphistomose (Jones et al., 2018) et *Austropeplea tomentosa* également impliqué dans la transmission de la fasciolose (Rathinasamy et al., 2018). Cependant, il est à noter que ces études, y compris la nôtre, nécessitent encore d'être testées sur une plus grande diversité de milieux naturels pour s'assurer de leur fonctionnement



systématique *in natura*. Nous concernant, nous avons cherché à améliorer notre capacité à identifier les sites à risque d'émergence de bilharziose urogénitale en développant un outil de détection de l'ADNe de *B. truncatus* à partir de simples prélèvements d'eau. Afin d'obtenir un outil de diagnostic abouti, nous avons opté pour une approche comparative, les résultats de l'outil de détection par ADNe directement appliqué en milieux naturels ont été systématiquement comparés avec les résultats d'une prospection visuelle classique menée en même temps que le diagnostic ADNe pour chaque site prospecté.

#### a. Détection ciblée de *Bulinus truncatus* par ADN environnemental

- **Publication 3 : Mulero, S. ; Boissier, J. ; Allienne, JF. ; Quilichini, Y. ; Foata, J. ; Pointier, JP. ; Rey, O. (2020). Environmental DNA for detecting *Bulinus truncatus*: A new environmental surveillance tool for schistosomiasis emergence risk assessment. *Environmental DNA*, 2(2): 161. Doi: 10.1002/edn3.53**

La première étape de ce travail a été de faire une méta-analyse de tous les protocoles existants pour le prélèvement d'eau et de sédiments en ADNe. J'ai donc passé en revue 47 études portant sur le développement d'outils de diagnostics par ADNe et datant de 1987 à 2018 afin de déterminer quels étaient les protocoles d'échantillonnages les plus couramment utilisés et donc susceptibles de fournir des résultats fiables, **Annexe 1**. Cette base de données a été ensuite étoffée par des articles de revues publiés en 2019 (Epp, Zimmermann, & Stoof-Leichsenring, 2019; Tsuji et al., 2019). Aussi bien ma base de recherche que les articles ultérieurs corroborent le fait qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthodes standardisées d'échantillonnage en ADNe, ce qui génère des contraintes de réplicabilité en cas de réutilisation d'un protocole trouvé dans la littérature, notamment quand il est appliqué dans des milieux naturels différents de l'étude initiale (Dickie et al., 2018). Les choix en termes de matériel et de méthode sont généralement faits à la discrétion des différentes équipes de recherche pour respecter un bon compromis entre la facilité d'échantillonnage, le temps et les coûts en matériel (Hinlo, Gleeson, Lintermans, & Furlan, 2017). Malgré ce manque de standardisation des protocoles ADNe, ces derniers peuvent toutefois être subdivisés en trois étapes : (i) le prélèvement des échantillons ; (ii) la préservation des échantillons ; (iii) l'extraction et l'amplification d'ADN (Dickie et al., 2018). Parmi ces trois étapes, seule l'étape d'amplification de l'ADN est quant à elle relativement standardisée car elle est dépendante

du kit de PCR ou qPCR utilisé et donc du protocole des fabricants (Hinlo et al., 2017; Dickie et al., 2018; Epp et al., 2019; Tsuji et al., 2019). En ce qui concerne les prélèvements d'eau, la filtration d'eau demeure la méthode la plus efficace, car elle permet de récupérer une plus grande quantité d'ADNe que les autres méthodes existantes telles que les échantillonnages de faibles volumes précipités, (*i.e.* fixés par ajout d'acétate de sodium et d'éthanol) (Hinlo et al., 2017; Dickie et al., 2018 ; **Annexe 1**). Ces similitudes notables ont donc été des bases de travail à partir desquelles j'ai développé nos outils de diagnostics présentés dans les publications suivantes.

La seconde étape de cet axe a consisté à chercher un marqueur moléculaire permettant de discriminer l'ADN de *B. truncatus* parmi l'ADN de toutes les autres espèces connues et séquencés, ceci par amplification d'ADN en PCR et qPCR. Nous nous sommes donc concentrés sur le gène de la cytochrome c oxydase 1 (*cox1*) utilisée dans de nombreuses études pour l'identification d'ADNe animal (Tsuji et al., 2019). Par rapport aux caractéristiques d'un fragment d'ADN libre (*i.e.* fragment d'ADN généralement court et sujet à une forte dégradation par les nucléases ; Goldberg et al., 2013; Barnes et al., 2014), ce gène présente l'avantage d'être dans le génome mitochondrial, un génome présent en plusieurs copies au sein d'une même cellule et ayant une conformation d'ADN circulaire, ce qui le rend plus difficilement dégradable par les nucléases (Deiner et al., 2017). À partir de ce marqueur, j'ai mis au point une pipeline bio-informatique pour générer des amorces spécifiques à *B. truncatus* notamment basée sur l'utilisation d'une série d'outils testés et validés lors de précédentes études. J'ai notamment utilisé OBTools (Boyer et al., 2016) qui permet de simuler *in silico* des réactions de PCR sur des communautés fictives de séquences d'ADN définies par l'utilisateur à partir de séquences provenant des bases de données publiques (*e.g.* Barcode of Life (BOLD), (Ratnasingham and Hebert, 2007) et le National Center for Biotechnology Information (NCBI), Genbank). Nous avons développé et adapté un processus de validation des amorces par PCR virtuelles successives (Mulero, Boissier, et al., 2020). Tout d'abord une validation par PCR virtuelle sur le jeu de données ayant servi à la création des amorces et contenant 210 séquences de *cox1* de plusieurs souches de *B. truncatus* afin de vérifier que les amorces fonctionnent sur toutes les souches de bullins connues et séquencées (Mulero, Boissier, et al., 2020). Une seconde PCR virtuelle sur un large jeu de données contenant l'ADN mitochondrial partiel ou complet de plus de 14 500 espèces de mollusques

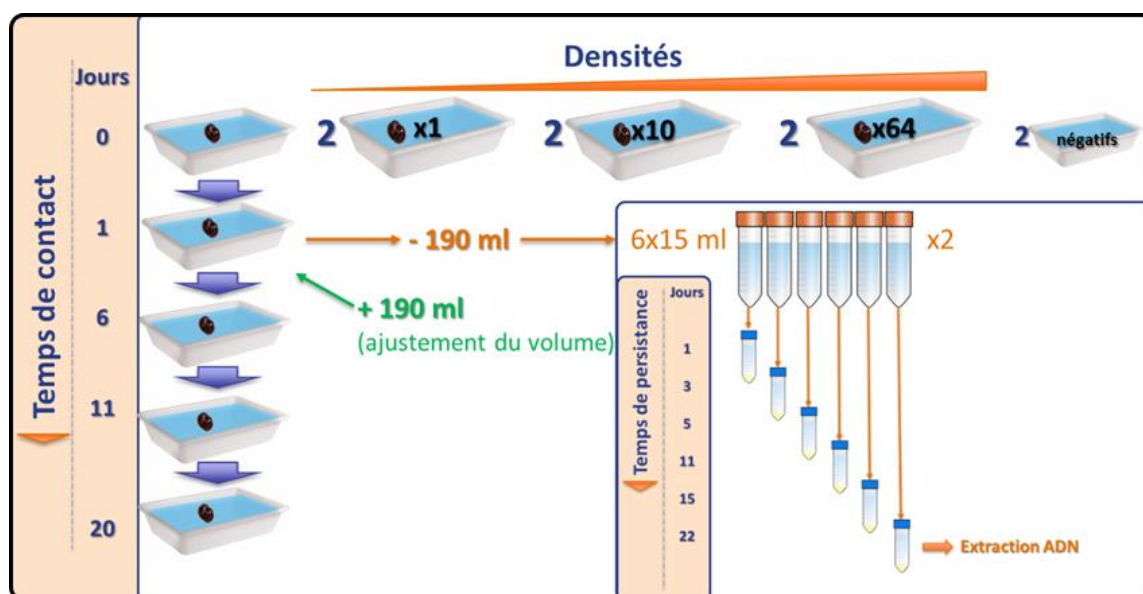
(avec redondances possibles), afin de tester la spécificité des amorces à l'ADN de *B. truncatus* dans des environnements fictifs contenant l'ADN mitochondrial de toutes les espèces de mollusques connues et dont les séquences sont disponibles (Mulero, Boissier, et al., 2020). Enfin, une dernière PCR virtuelle contre la base de données NCBI Ref-seq non redondante (*i.e.* ~ 217 millions de séquences) contenant les séquences de toutes les espèces connues et séquencées quel que soit le gène d'origine et le rang taxonomique (Mulero, Boissier, et al., 2020). Les amorces ainsi générées ont ensuite été testées en PCR *in vitro* sur des mélanges d'ADN extraits de plusieurs espèces de mollusques ainsi que sur ces mêmes ADN, mais testés indépendamment (Mulero, Boissier, et al., 2020).

Une fois les amorces générées, il nous a fallu développer un protocole d'échantillonnage pour capturer l'ADN libre du mollusque dans l'environnement. Mon objectif étant d'avoir une information récente sur la présence de *B. truncatus* dans l'environnement, nous nous sommes intéressés à la détection d'ADNe à partir de prélèvements d'eau, un compartiment dans lequel un ADN libre persiste quelques jours à un mois (Dejean et al., 2011).

### Développement de l'outil de diagnostic en mésocosme

Avec notre protocole développé et testé *in vitro*, nos premières tentatives pour tester notre capacité à amplifier l'ADNe de *B. truncatus* en milieu contrôlé (*i.e.* mésocosmes) ont été effectuées dans le cadre du stage de Master 1 d'Anaïs Loisier que j'ai co-encadré en 2018 sur une période de plus de 3 mois. Pour cela, nous avons fait varier des paramètres connus pour impacter la quantité et la dynamique de l'ADN libre dans l'eau, notamment la densité d'individus émetteurs, l'exposition aux UV qui peut rapidement dégrader l'ADN libre et la température qui peut modifier la dynamique d'émission d'ADNe (Barnes et al., 2014), bien que le rôle de certains de ces paramètres tels que les UV ait été remis en question lors d'études ultérieures (Machler, Osathanunkul, & Altermatt, 2018). La première expérience de densité/persistance a été réalisée dans nos infrastructures sous conditions contrôlées (*i.e.* photopériode équilibrée 12h : 12h et température constamment maintenue à 24°C). L'expérience de densité a consisté en une cinétique en miroir en faisant varier, d'une part, le temps de contact entre diverses densités de bullins avec l'eau (*i.e.* temps de contact), et d'autre part, en faisant varier le temps entre le retrait des mollusques des bacs et l'extraction d'ADNe (*i.e.* temps de persistance). Les mollusques ont été placés par lots de 1, 10 et 64

individus dans des bacs remplis avec 3,1 litres d'eau de forage, toutes ces séries ont été dupliquées (soit des densités finales de 0,3, 3,3 et 20,6 individus par litres) **Figure 13**. En parallèle un contrôle négatif consistant en deux bacs contenant uniquement de l'eau de forage a été mis en place dans les mêmes conditions que les bacs expérimentaux. Les mollusques furent laissés dans les bacs 20 jours et nourris *ad libitum*. Compte tenu du faible volume des bacs et du biais qu'entraînerait un remplacement d'eau trop conséquent lors de chaque prélèvement, la technique de prélèvement employée a été la précipitation (*i.e.* prélèvement de faibles volumes d'eau fixes directement dans un récipient, puis précipitation et conservation de l'ADN par ajout d'acétate de sodium et d'éthanol ; Ficetola et al., 2008). Ainsi, à chaque temps de contacts (*i.e.* 1, 6, 11 et 20 jours) deux séries de 6 tubes de 50 ml contenant 15 ml d'eau des bacs ont été collectées (190 ml au total), puis le volume des bacs a été réajusté par ajout d'eau de forage. Les tubes ainsi collectés ont été conservés à l'air libre dans les mêmes conditions que les bacs contenant les mollusques pour une période allant de 1 à 22 jours afin de quantifier la cinétique de persistance de l'ADN peut persister dans l'eau. Pour chaque temps de persistance, un répliqua a été précipité puis l'ADN a été extrait en suivant le protocole tissu du kit E.Z.N.A® Tissue DNA kit (OMEGA Bio-Tek, USA).



**Figure 13. Schéma synthétique de l'expérience en mésocosme sur la persistance de l'ADN de *B. truncatus*.** En fonction de la densité de mollusques, du temps de contact des mollusques avec l'eau (contact) et du temps écoulé après retrait des mollusques (persistance). Lors de chaque prélèvement de 190 ml (flèches orange), le volume des bacs a été réajusté avec 190 ml d'eau de forage (flèches vertes).

À partir des eaux des deux bacs expérimentaux ayant accueilli chacun 64 mollusques pendant 27 jours lors de l'expérience sur la densité/persistance, nous avons réalisé l'expérience testant l'effet de l'ensoleillement sur la persistance de l'ADNe. Ces deux volumes d'eau avec lesquels nous sommes parvenus à détecter l'ADNe de *B. truncatus* ont été mélangés puis répartis dans 6 bacs de 1 litre. Trois de ces bacs ont été couverts par une plaque en plexiglas laissant passer les rayons ultraviolets, mais protégeant les bacs des intempéries notamment la précipitation qui peuvent fausser nos résultats. Les trois autres bacs ont été recouverts par une planche de bois bloquant tout rayonnement solaire. À chaque pas de temps fixés (*i.e.* 1, 2, 3, 7 et 10 jours), 15 ml d'eau ont été prélevés dans chaque bac expérimental puis précipités et extraits selon le même protocole que celui décrit ci-dessus.

Enfin pour l'expérience température, nous avons placé 6 lots de 22 mollusques dans des bacs de 900 ml d'eau de forage, soit une densité de 24,4 mollusques par litre. Trois traitements de températures (*i.e.* 10°C, 26°C et 30°C) ont été appliqués sur des dupliqua de bacs, ces températures sont compatibles avec la survie de *B. truncatus* (Rubaba, Chimbari, & Mukaratirwa, 2016; Mulero et al., 2019) et reflètent les variations de température mesurées dans les rivières méditerranéennes à différentes périodes de l'année. Les deux bacs laissés à 10°C ont été refroidis dans un bain-marie de 100 litres relié à un dispositif de pompe réfrigérante (AquaVie ice 2000) alors que les deux bacs laissés à 30°C ont été réchauffés dans un bain-marie de 100 litres équipé de chauffages d'aquarium (Tetra HT 50). Afin d'éviter tout choc thermique, une période d'acclimatation des mollusques par baisse/augmentation progressive de la température sur 4 jours a été respectée avant le début de l'expérience. C'est après l'acclimations que les mollusques ont été placés dans les bacs expérimentaux afin de débiter l'expérience dans des bacs dépourvus d'ADN de mollusques. Dès lors, un prélèvement d'eau de 45 ml par bacs (*i.e.* un tripliqua de 15 ml) a été réalisé 1, 7 et 14 jours après le début de l'expérience. Ces échantillons ont été précipités puis extraits selon le même protocole que pour les deux expériences précédemment décrites.

À la suite de l'expérience sur la densité/persistance, seulement 9,38% des 296 échantillons ont été positifs à l'ADN de *B. truncatus* **Annexe 2**, cependant nous avons été capables de détecter des quantités d'ADNe minimales équivalentes à une densité de 0,32 individu/litres en mésocosme. Les expériences faisant varier la température et la



présence/absence d'ensoleillement ont également abouti à un résultat peu concluant avec peu d'échantillons positifs et aucun effet significatif de la température sur la quantité d'ADNe libérée ou de l'ensoleillement sur la persistance de l'ADNe. De ces résultats nous avons tiré trois conclusions : (i) L'extraction d'ADNe par précipitation ne permet pas d'obtenir des signaux homogènes et cohérents. En effet, l'extraction d'ADNe par précipitation, bien qu'elle soit la méthode la moins chère et la plus simple à mettre en œuvre, entraîne une perte d'ADNe lors des étapes successives de lavage en plus d'induire une dégradation mécanique de l'ADNe (Wilcox et al., 2013). (ii) La première version des amorces spécifiques à *B. truncatus* que nous avons développés dans le cadre de cette étude semblaient présenter quelques problèmes de stabilités lors des étapes d'hybridation des amorces et nécessitaient donc encore des mises au point. (iii) L'approche de mésocosme est utile pour simuler l'effet de variables environnementales sur la dynamique de l'ADNe, cependant ce type d'approche ne permet pas de considérer l'ensemble de la complexité d'un environnement naturel. Pour ces raisons, nous avons décidé de recréer des amorces spécifiques à *B. truncatus* ayant une meilleure stabilité lors de l'hybridation et de les tester directement en milieu naturel en utilisant un protocole d'échantillonnage plus efficace, à savoir la filtration d'eau.

### Application de l'outil de diagnostic en milieu naturel

Afin de valider notre diagnostic *in natura*, nous avons profité des données de présence/absence sur *B. truncatus* récoltées dans les rivières du sud de la Corse à la suite de l'émergence de bilharziose urogénitale de 2013 (Boissier et al., 2016) pour développer notre outil directement sur le terrain. L'étude a été réalisée sur deux rivières, le Cavu relié à la majorité des cas de 2013 et la Solenzara reliée aux cas les plus récents (Boissier et al., 2016; Noel et al., 2018; Ramalli et al., 2018). Ces deux rivières sont des environnements lotique (*i.e.* eau avec courant). Ce sont des eaux cristallines peu chargées en matière organique, d'une topologie constituée d'une succession de piscines naturelles dont certains passages du cours de la rivière sont en souterrain, les températures de l'eau peuvent y excéder les 30°C en période estivale (Boissier, Kincaid-Smith, et al., 2015). Ces rivières sont par ailleurs hautement fréquentées pendant la haute saison avec 3000 à 5000 personnes par jours recensées sur le Cavu (Boissier, Kincaid-Smith, et al., 2015). Afin d'identifier les paramètres d'échantillonnage optimaux dans ce type de milieux, nous avons établi un protocole tenant compte de : (i) du

volume d'eau filtrée, en variant les volumes d'eau (*i.e.* 1, 3 et 5 litres) ; (ii) de la zone de prélèvement sur le tronçon de rivière, en dupliquant nos prélèvements à la fois sur la rive à proximité des herbiers appréciés par les bullins, mais aussi au centre du cours d'eau. En effet, nous suspicions à l'époque qu'une quantité accrue de matière organique pouvait influencer sur notre capacité à détecter l'ADNe, et les rives de ces rivières sont couvertes de végétaux et plus fréquentées par les organismes, cela a d'ailleurs été confirmé lors d'études ultérieures (van Bochove et al., 2020). De plus, le centre des rivières présente généralement de plus forts courants susceptibles de transporter l'ADNe d'organismes présents en amont du point d'échantillonnage (Deiner, Fronhofer, Machler, Walser, & Altermatt, 2016; Mulero, Boissier, et al., 2020) ; (iii) de la densité locale en *B. truncatus*, en effectuant ce plan d'échantillonnage sur 5 sites, 4 sur la rivière Cavu avec des densités en *B. truncatus* variant de 0 individu/m<sup>2</sup> à plus de 100 individus/m<sup>2</sup> (*i.e.* 0, 10, 50 et >100 individus/m<sup>2</sup>) et un site sur la Solenzara présentant une forte densité de >100 bullins/m<sup>2</sup>.

Afin de contrôler pour des effets de contaminations potentiels tout au long du processus (depuis le terrain jusqu'à l'amplification de l'ADN extrait), des contrôles négatifs ont été effectués à chaque étape clé de notre protocole. Tout d'abord, nous avons effectué des contrôles négatifs de terrain qui consistaient en une série de filtrations réalisées en dehors de la Corse dans un canal de l'Université de Perpignan dans lequel *B. truncatus* n'a jamais été reporté. Chacun de ces échantillons a été filtré et conservé en suivant le protocole amélioré mis en place pour cette étude (Mulero, Boissier, et al., 2020). Ensuite des contrôles négatifs ont été réalisés pour chaque site, ces derniers consistaient en une filtration d'eau minérale en même temps que la série de filtrations effectuées sur chaque site, ces unités de filtration « contrôle » ont ensuite été préservées et extraites selon le même protocole que pour les unités de filtrations d'eau de rivière et en utilisant les mêmes outils (*i.e.* pinces et scalpel). Enfin des contrôles négatifs ont été réalisés lors de chaque série d'extractions d'ADNe (*i.e.* des colonnes d'extractions remplies d'eau ultrapure et extraites en même temps que les échantillons de terrain) et lors de chaque série de PCR (*i.e.* des réactions de PCR dont l'ADN a été remplacé par de l'eau ultrapure).

Enfin, nous avons voulu tester l'efficacité et la sensibilité de deux approches moléculaires employées dans la littérature pour amplifier de l'ADN provenant d'échantillons environnementaux. La qPCR, classiquement employée dans ce type d'études, qui permet

d'avoir une haute sensibilité et spécificité et de faire de la quantification ou semi-quantification de l'ADN cible en fonction du nombre de répliquas positifs (Wilcox et al., 2013; Tsuji et al., 2019). La PCR digitale ou ddPCR, une technologie plus onéreuse qui permet une quantification sensible et absolue d'un ADN cible sans réaliser de courbe de calibration au préalable (*i.e.* gamme de dilution de référence ; Nathan, Simmons, Wegleitner, Jerde, and Mahon, 2014; Tsuji et al., 2019). Un outil souvent décrit comme plus sensible que la qPCR dans la littérature même en présence d'inhibiteurs de PCR (Doi et al., 2015; Tsuji et al., 2019). Pour chacun de ces deux outils, une paire d'amorces différentes a été générée sur le même marqueur mitochondrial (*i.e.* *cox1*).

Les résultats obtenus furent probants. En effet, quelle que soit la technologie de PCR employée les résultats ont été strictement identiques, tous les sites pour lesquels le mollusque a été visuellement reporté furent positifs à l'ADN de *B. truncatus* (à l'exception d'un échantillon de 1 litre prélevé sur le site présentant la plus faible densité en bullins). De même, tous les sites dépourvus de bullins ainsi que l'ensemble des contrôles négatifs (*i.e.* eau minérale) étaient négatifs. Nous avons pu quantifier une sensibilité minimale de 60 copies d'ADN/ml d'eau, soit 100% de sensibilité pour les volumes de 3 et 5 litres et 91,7% de sensibilité pour les prélèvements de 1 litre. La spécificité à *B. truncatus* était quant à elle de 100%, aucun signal aspécifique n'a été identifié. Nos analyses statistiques ont suggéré une efficacité optimale de l'outil avec des volumes égaux ou supérieurs à 3 litres, et de préférence filtrés au centre du tronçon de rivière, ce qui supporte les hypothèses précédentes sur le transport de l'ADNe par les courants (Deiner et al., 2016). La PCR digitale s'est démarquée par rapport à la qPCR, car cette dernière permet de faire une quantification absolue de l'ADN amplifié à partir d'un seul échantillon alors qu'en qPCR il est nécessaire de réaliser des répliquas et de générer une courbe standard pour atteindre ce niveau de précision.

# Environmental DNA for detecting *Bulinus truncatus*: A new environmental surveillance tool for schistosomiasis emergence risk assessment

Stephen Mulero<sup>1</sup>  | Jérôme Boissier<sup>1</sup>  | Jean-François Allienne<sup>1</sup> |  
Yann Quilichini<sup>2</sup>  | Joséphine Foata<sup>2</sup> | Jean-Pierre Pointier<sup>3</sup> | Olivier Rey<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, University of Perpignan, Perpignan, France

<sup>2</sup>UMR SPE 6134, CNRS – Università di Corsica Pascal Paoli, Corte, France

<sup>3</sup>USR3278 CRILOBE EPHE-CNRS-UPVD, PSL University, Perpignan, France

## Correspondence

Olivier Rey, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, University of Perpignan, F-66860 Perpignan, France.  
Email: olivier.rey@univ-perp.fr

## Funding information

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, Grant/Award Number: PNREST 2019/1/059 Molrisk; Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-18-CE35-0001

## Abstract

Under ongoing climate changes, the development of large-scale monitoring tools for assessing the risk of disease emergence constitutes an urging challenge. This is particularly the case for snail-borne diseases such as the urogenital bilharziasis that emerged in Corsica and threat European countries. The expansion of this tropical disease mainly relies on the local presence of competent snail hosts such as *Bulinus truncatus*. Unfortunately, very little is known about the actual repartition of freshwater snails worldwide which makes new emergences difficult to predict. In this study, we developed two ready-to-use environmental DNA-based methods for assessing the distribution of *B. truncatus* from water samples collected in the field. We used two approaches, a quantitative PCR (qPCR) and a droplet digital PCR (ddPCR) approach. We successfully detected *B. truncatus* in natural environments where the snail was previously visually reported. Our environmental DNA diagnostic methods showed a high sensitivity ( $\approx 60$  DNA copy per mL of filtered water) and a high specificity to *B. truncatus*. Results obtained in qPCR and ddPCR were very similar. This study demonstrates that environmental DNA diagnostics tools enable a sensitive large-scale monitoring of snail-borne diseases hence allowing the delimitation of areas potentially threatened by urogenital schistosomiasis.

## KEYWORDS

*Bulinus truncatus*, Corsica, ddPCR, environmental DNA, environmental monitoring, qPCR, schistosomiasis

## 1 | INTRODUCTION

Global changes, including climate changes (e.g., temperatures, precipitations), land use, chemical pollutants, and human-driven dispersion, greatly modify the spatial distribution of organisms at a global scale (Parmesan & Yohe, 2003; Pereira et al., 2010). While some

species become locally extinct due to climatic and/or anthropic pressures (Pereira et al., 2010), other species extend their geographical range with some populations sometimes reaching impressive abundance at the global scale (i.e., invasive species; Capinha, Essl, Seebens, Moser, & Pereira, 2015). Such rapid changes in both the distribution and the abundance also concern pathogens (Jones et al.,

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Environmental DNA* published by John Wiley & Sons Ltd



2008; Kim, Kabir, & Ara Jahan, 2014), and the resulting (re-)emerging diseases constitute a threat to animal (Cohen et al., 2017; Gozlan, St-Hilaire, Feist, Martin, & Kent, 2005) and to human health (Blum & Hotez, 2018; Morens & Fauci, 2013). Understanding and predicting the dynamics and epidemiology of emerging diseases in response to environmental changes have thus become an urging challenge in the last decades (Ellwanger, Kaminski, & Chies, 2019).

Among the emerging diseases documented so far, 17% are induced by pathogens transmitted by vectors and/or intermediate hosts (i.e., vector-borne diseases; VBD) (WHO, 2017). Predicting the emergence and spread of VBD is particularly challenging because it requires knowledge on the distribution and the spatio-temporal dynamics of pathogens and of their intermediate hosts and/or vectors that are also potentially influenced by current global change (Blum & Hotez, 2018; Richards, Lord, Pesko, & Tabachnick, 2009). In this regard, recent studies together with the development of international monitoring networks (e.g., VBORNET in Europe; ECDC, 2011) have made it possible to establish real-time risk maps of emergence and spread of some arthropod-borne-diseases such as malaria, chikungunya, and dengue (ECDC, 2014; Schaffner et al., 2013).

The monitoring of snail-borne diseases (SBD), and more particularly those transmitted via freshwater snail species, still remains in its infancy (Kincaid-Smith, Rey, Toulza, Berry, & Boissier, 2017). The neglected aspect of most SBD diseases contrast with their significant impact on human health. For instance, more than 250 million peoples are infected by *Schistosoma* parasites worldwide (Stensgaard, Vounatsou, Sengupta, & Utzinger, 2019). This infectious disease is also responsible for more than 200,000 deaths per year (WHO, 2002). The SBDs concern several vertebrates including humans, livestock, and wild animals. Consequently, these diseases also have a significant economic impact especially in the livestock industry (e.g., 2.5€ billion of annual losses linked to the fascioliasis worldwide; Jones et al., 2018). They are induced by some parasites that depend on a snail host to complete their lifecycle. Our current knowledge on the distribution and dynamics of SBD mainly relies on epidemiological studies based on the prevalence and intensities of adult parasites within their definitive hosts (either humans or animals), while the distribution of snail species involved in the transmission of SBD is generally poorly documented (Kincaid-Smith et al., 2017). This lack of knowledge can be explained by at least four main reasons: first, until very recently, freshwater ecosystems received less ecological attention than terrestrial systems (Collen et al., 2014; Puth & Post, 2005). Second, the distribution of snail populations is highly heterogeneous at both the spatial and temporal scale which makes their monitoring difficult (Lamy et al., 2012). Third, the available classical methods used to collect and identify snail species are laborious and time-consuming and important sampling efforts are generally necessary for assessing, with certainty, the presence/absence of a targeted species in the field (Lamy et al., 2012). Thus, it is currently inconceivable to monitor snails' populations at large spatial and temporal scales. Finally, once the snails collected from a given site, the taxonomic identification of specimens at the species level requires thorough malacological expertise

and generally these identifications still need to be completed by DNA analyses.

Methods based on environmental DNA (eDNA) constitute a promising approach for monitoring biodiversity (Bohmann et al., 2014). These methods were recently applied in a parasitological context to detect (cryptic) parasite species, their hosts and/or vectors (Bass et al., 2015). In this respect, eDNA has been used for detecting targeted parasites species (Huver, Koprivnikar, Johnson, & Whyard, 2015; Richey et al., 2018; Rusch et al., 2018), for characterizing parasite communities (Hartikainen et al., 2016), and to a lower extent for the detection of parasites' vectors (e.g., the invasive mosquito vectors *Aedes albopictus*; Schneider et al., 2016). Regarding SBDs, studies have mainly focused on the detection of free-living parasite infectious stages present in the water including *Opisthorchis viverrini* (Hashizume et al., 2017); *Fasciola hepatica* (Jones et al., 2018); *Schistosoma japonicum* (Worrell et al., 2011); and *Schistosoma mansoni* (Sengupta et al., 2019). This approach targeted toward the detection of parasites is particularly relevant to identify active transmission sites, that is, where the parasite is currently present and susceptible to infect definitive hosts such as humans or livestock species. Surprisingly, very few studies have developed eDNA-based methods to detect the presence of snail species that constitute intermediate hosts for the parasites and that are thus responsible for the transmission of the associated diseases. To the best of our knowledge, eDNA-based methods were developed only for the detection *Galba truncatula* and *Austropeplea tomentosa* (Jones et al., 2018; Rathinasamy et al., 2018), both species being involved in the transmission of the liver fluke (*Fasciola hepatica*), and more recently for the detection of *Oncomelania hupensis* involved in the transmission of *S. japonicum* (Calata et al., 2019). Such approach targeted toward the detection of snail hosts is of prime interest to identify sites where the associated disease could emerge (Kincaid-Smith et al., 2017).

In this study, we develop an eDNA-based method to detect the presence of *B. truncatus* from freshwater water samples. This snail species hosts two flatworm parasites *S. bovis*, a cattle parasite, and *S. haematobium*, the latter being responsible for the urogenital form of schistosomiasis. The urogenital schistosomiasis is one of the most severe and prevalent forms of schistosomiasis in Sub-Saharan Africa threatening 436 million individuals and affecting 112 million people throughout the world (WHO, 2018). Moreover, infection with *S. haematobium* also constitutes an extra risk factor for secondary infections with other infectious agents such as HIV, especially in women (WHO, 2002). The morbidity associated with urogenital schistosomiasis fortunately globally decreased in the last decades although its prevalence has increased throughout Africa (Herricks et al., 2017). Moreover, the future distribution of this disease in response to climate change is difficult to predict at the continental scale (Blum & Hotez, 2018) and outside the endemic area (Kincaid-Smith et al., 2017). In this regard, an outbreak of urogenital schistosomiasis has recently occurred in Southern Europe in Corsica (Boissier et al., 2016; Holtfreter, Mone, Muller-Stover, Mouahid, & Richter, 2014). This situation has called for an urgent need to develop environmental



diagnosis tools to monitor the distribution of compatible freshwater mollusks and hence predict possible new transmission sites in Europe (Kincaid-Smith et al., 2017).

Importantly, no vaccine exists against schistosomiasis and mass chemotherapy by the administration of praziquantel, an anti-helminth drug, remains the main strategy to control the disease in endemic areas. Today, the control of snail populations under a certain threshold to limit transmission is acknowledged as a complementary strategy necessary to eradicate schistosomiasis (Bergquist et al., 2017). Better characterizing the distribution of host snails is thus fundamental for targeting snail control strategies. So far, eDNA-based methods were developed to detect the presence of free-living stages (cercariae) of *S. japonicum* (Worrell et al., 2011) and *S. mansoni* (Sengupta et al., 2019) present in the water and susceptible to infect humans, or within their snail hosts (Amarir et al., 2014), but no methods were developed to detect host snail species except for *O. hupensis* (Calata et al., 2019).

We here propose a ready-to-use eDNA protocol to detect the presence of *B. truncatus* established in natural river streams from water samples. We also compared a classical optimized qPCR approach to a protocol using the droplet digital PCR technology (ddPCR), also called "third PCR generation" that provides interesting properties for its application in eDNA (Doi, Takahara, et al., 2015). First, ddPCR allows the absolute quantification of low levels of nucleic acids. Second, this technology is expected to be more robust and hence provide more repeatable results when amplifying DNA in the presence of PCR inhibitors (Hindson et al., 2011; Taylor, Laperriere, & Germain, 2017), the latter being an important technical hurdle in eDNA studies (Doi, Takahara, et al., 2015). So far, only 11 studies used ddPCR for eDNA detection (Baker et al., 2018; Coble et al., 2019; Doi, Takahara, et al., 2015; Doi, Uchii, et al., 2015; Hunter, Ferrante, Meigs-Friend, & Ulmer, 2019; Hunter, Meigs-Friend, Ferrante, Smith, & Hart, 2019; Jerde et al., 2016; Nathan, Simmons, Wegleitner, Jerde, & Mahon, 2014; Rusch et al., 2018; Uthicke, Lamare, & Doyle, 2018; Wacker et al., 2019). Based on our results, we compare and discuss the pros and cons of these two approaches in an eDNA context.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Field sampling

#### 2.1.1 | Sampling sites

We focused our sampling on five sites along the Cavu and the Solenzara Rivers (Corsica), two geographically isolated rivers where a urogenital schistosomiasis outbreak occurred very recently (Boissier et al., 2016; Ramalli et al., 2018) (Table 1). These sites in Corsica were chosen because the temporal dynamic of the local *B. truncatus* populations is monitored in these two rivers annually since 2014. In the Cavu River, we sampled water from three sites where populations of *B. truncatus* are well established and where

transmission occurred (Table 1): at the Mulinu Bridge, hereafter denoted "MB"; at the recreational A Tyroliana Park, hereafter named "AT," and at the "3 Pool" site, hereafter denoted "3P" these sites respectively correspond to site 5, 8, and 9 in Boissier et al. (2016). We sampled water from a fourth site upstream the Cavu River, hereafter denoted "WI" (i.e., Water Intake; corresponding to site 10 in Boissier et al., 2016) where no *B. truncatus* has ever been observed. This site was sampled to validate or invalidate the absence of *B. truncatus* at this site so far determined through visual inspection only. Along the Solenzara River, we sampled water from one site (the U Rosumarinu Snack, hereafter denoted "UR") where local infection with schistosomiasis occurred recently (Noel et al., 2017). Additionally to these sampling sites in Corsica, we also sampled water from an artificial channel in Perpignan city (Southern France) where *B. truncatus* never occurred. This site was considered as a field negative control. All samples were collected during the first week of September 2018. This period succeeds to the highest density period of *B. truncatus* in Corsican rivers (i.e., august; Kincaid-Smith et al., 2017) and before high-water period (i.e., October–November). At each site, we also measured environmental conditions: including water temperature, pH, flow at the water surface (measured in the river bed), and human activity (i.e., presence/absence of anthropic structures/individuals).

#### 2.1.2 | Water sampling protocol

Our sampling protocol was designed to quantify possible effects of filtration volume and sampling location relative to the streambed (i.e., shore vs. streambed of the river) on our ability to detect *B. truncatus* DNA at a given site. To this aim, a total of 7 water samples were collected at each site. Specifically, three water volumes (1, 3, and 5 L) were filtered at two different locations within the river (i.e., shore vs. streambed) at each sampling site. Moreover, 500 ml of commercial spring water was filtered at each site and rigorously following the same protocol as a technical field negative control. Each water filtration was achieved using a filtration unit including a 0.45- $\mu$ m PES sterile membrane of 90 mm (VWR PES filter Unit 1 L, Model 514-0301) connected to a manual vacuum pump (Mityvac, Model MV8500). This mesh size constitutes a good compromise between membrane clogging rate and eDNA capture capacity for lotic environment (Hinlo, Gleeson, Lintermans, & Furlan, 2017). The resulting filtration membrane was then removed from its initial filtration unit, immediately stored in a 50 ml falcon filled with a Longmire buffer (Longmire, Maltbie, & Baker, 1997), and stored at room temperature until subsequent DNA extraction. We followed classical specific recommendations to avoid DNA contamination overall the sampling process (Taberlet, Coissac, Hajibabaei, & Rieseberg, 2012). In particular, scissors and forceps used to remove the membranes from filtration units were decontaminated before each sampling by successively placing instruments in a 10% bleach bath during 1 min, 1 min in a DNA AWAY™ solution (Thermo Scientific) followed by a flame sterilization step.



**TABLE 1** Geographical coordinates (using Google Mercator projection), biotic, and abiotic parameters at each prospected sites

| Site acronym             | MB                           | AT                           | 3P                            | WI                            | UR                            | Control                      |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Geographical coordinates | 41°42'16.82"N<br>9°20'5.23"E | 41°43'12.22"N<br>9°18'6.27"E | 41°43'53.14"N<br>9°17'36.87"E | 41°44'29.30"N<br>9°17'39.58"E | 41°50'37.86"N<br>9°20'36.87"E | 42°40'55.60"N<br>2°54'4.14"E |
| Sampling date            | 26/09/2018<br>3:30 p.m.      | 26/09/2018<br>11:40 a.m.     | 26/09/2018<br>9:40 a.m.       | 26/09/2018<br>8:30 a.m.       | 27/09/2018<br>9 a.m.          | 04/10/2018<br>15 p.m.        |
| pH                       | 8.3                          | 8.5                          | 8.7                           | 9                             | 8.3                           | 8.4                          |
| T (°C)                   | 21.5                         | 20                           | 18.8                          | 18                            | 19.5                          | 17.4                         |
| Human activity           | Yes                          | Yes                          | Yes                           | Yes                           | Yes                           | No                           |
| Water flow               | 1 m/s                        | 0.5 m/s                      | 1 m/s                         | 0.1 m/s                       | 0.5 m/s                       | 0.5 m/s                      |
| Snail density            | 10/m <sup>2</sup>            | 50/m <sup>2</sup>            | >100/m <sup>2</sup>           | 0/m <sup>2</sup>              | >100/m <sup>2</sup>           | 0/m <sup>2</sup>             |

Abbreviations: 3P, 3 Pool; AT, A Tyroliana Park; Control, Perpignan University channel; MB, Mulinu Bridge; UR, Solenzara snack; WI, Water intake.

| Snail species                                | Origin          | Sampling date | Collaborators                  |
|----------------------------------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|
| <i>Bulinus truncatus</i> <sup>a</sup>        | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Bythinia tentaculata</i>                  | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Radix balthica</i> <sup>a</sup>           | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Ancylus fluviatilis</i> <sup>a</sup>      | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Gyraulus laevis</i>                       | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Gyraulus sp.</i> <sup>a</sup>             | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Physa acuta</i> <sup>a</sup>              | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Potamopyrgus antipodarum</i> <sup>a</sup> | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Pysidium sp.</i>                          | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Theodoxus fluviatilis</i>                 | Corsica, France | 2018          |                                |
| <i>Biomphalaria glabrata</i>                 | Brazil          | 2018          |                                |
| <i>Bulinus forskalii</i>                     | South-Africa    | 2017          | Tine Huyse, KU Leuven, Belgium |
| <i>Bulinus globosus</i>                      | Senegal         | 2012          | Tine Huyse, KU Leuven, Belgium |
| <i>Bulinus africanus</i>                     | South-Africa    | 2017          | Tine Huyse, KU Leuven, Belgium |
| <i>Radix natalensis</i>                      | South-Africa    | 2017          | Tine Huyse, KU Leuven, Belgium |
| <i>Galba truncatula</i>                      | Corsica, France | 2018          |                                |

<sup>a</sup>Species which occurrence was reported in the Cavu River and/or Solenzara River.

To evaluate the repeatability of our results, technical duplicates were achieved at two sampling sites (i.e., MB and AT) for which we respectively observed the lowest *B. truncatus* density (≈10 mollusks/m<sup>2</sup>) and an intermediate density of ≈50 mollusks/m<sup>2</sup>. A total of 13 filtering membranes were thus obtained for each of these two sites ([3 filtrations volumes × 2 river localities × 2 duplicates] + 1 technical negative control).

Once all the water samples were collected, a visual inspection was achieved to qualify the local density of *B. truncatus* in the sampling area (low: 10–50 mollusks; medium: 50–100 mollusks; and high: more than 100 mollusks). This was achieved by inspecting rocks and the vegetation on a 1 m<sup>2</sup> surface on the shore of the river and following the same capture effort (30 min per site).

**TABLE 2** Snails' species used for assessing the specificity of the developed qPCR and ddPCR primers

## 2.2 | Development of qPCR primers

### 2.2.1 | In silico development of qPCR primers

To design specific primers, we focused on the mitochondrial *cytochrome c oxidase I (cox1)* gene that have been first proposed for bar-coding studies on animal DNA (Hebert, Cywinska, Ball, & deWaard, 2003) and classically (although not exclusively) used for the detec-tion of animal eDNA (Tsuji, Takahara, Doi, Shibata, & Yamanaka, 2019). A total of 25 primer pairs were developed based on an align-ment of 210 *cox1* sequences from *B. truncatus* from several countries available from the Barcode of Life Database BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007) to account for intraspecific variability. Primer pairs

were designed using Geneious® 8.1.4. (Kearse et al., 2012) and following classical criteria so as to optimize hybridization. The specificity of the resulting primer pairs to *B. truncatus* was first assessed in silico. To do so, a local database regrouping *cox1* sequences from 14,500 *Mollusca* species and available on BOLD and NCBI nucleotide databases was first created. Virtual PCRs using our designed primer sets were ran on the resulting database using ecoPCR 0.5.0. (Boyer et al., 2016) for detecting possible cross-amplification on related snail species. To check whether these primers could amplify a similar amplicon on other nonfreshwater mollusk species, we also ran a Primer-BLAST analysis against the nr database (Ye et al., 2012). The nr database contains nonredundant set of sequences (i.e., genomic DNA, transcripts, and proteins) from several databases hence allowing the use of BLAST analysis against DNA sequences from other species. This bioinformatic pipeline is summarized in Figure S1. All primer pairs showing a 100% specificity to *B. truncatus* ( $N = 4$ ) were kept for subsequent qPCR specificity tests.

### 2.2.2 | Testing the specificity of the qPCR primers

The specificity of the resulting qPCR primers was assessed in vitro by qPCR on DNA templates from a total of 16 freshwater snail species (see Table 2), including three *B. truncatus* sister species (i.e., *B. forskalii*, *B. globosus*, and *B. africanus*). Moreover, qPCRs were also performed on an equimolar pool of DNA extracts from each of these 16 species (at 0.5 ng/μl each) and including or excluding *B. truncatus* DNA. Only the primer pairs amplifying exclusively *B. truncatus* DNA in individual DNA or pooled DNA were kept for the ensuing experiment.

## 2.3 | Molecular analyses

All molecular experiments were carried out under a sterile table top hood. Before and after each protocol (i.e., DNA extraction, PCR reaction preparation), the working surface was bleached, washed using a DNA AWAY™ solution (Thermo Scientific™), and then exposed to UV light during one hour.

The DNA positive controls were extracted from 5 *B. truncatus* individuals that were collected in the field in Corsica. Total genomic DNAs from these mollusks were extracted using the E.Z.N.A.® Tissue DNA kit (OMEGA Bio-Tek, Inc) following the “tissue protocol” for animal tissues, supplied in the kit handbook.

Total DNA from each membrane was extracted using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) which is commonly used in eDNA studies and which is supposed to yield an important amount of extracted DNA (Goldberg et al., 2016; Hinlo et al., 2017). We followed an adapted version of the “tissue” protocol from the kit handbook. Briefly, membranes were subdivided into 4 equal sections to allow the use of microcentrifuge tubes during subsequent extraction steps. Lysis was performed at 65°C during 1 hr using a final solution containing 567 μl of ATL buffers and 63 μl of proteinase K. We next

added 630 μl of AL buffers and 630 μl of 100% ethanol in the following steps (steps 2 and 3). The subsequent steps were performed following the manufacturer protocol, and the resulting genomic DNA was finally eluted in 100 μl of AE buffer. At the end of the extraction, we thus obtained four eluates of 100 μl for each membrane.

### 2.3.1 | Quantitative PCR approach

The four sections from each membrane were analyzed twice meaning that a total of 8 qPCR reactions were ran for each membrane. A total of 200 sections from 50 filter membranes (4 sections per membranes) were thus duplicated and processed in qPCR. Hence, 400 qPCR reactions were used for analyzing the 50 membranes collected. These 400 reactions were performed on two independent qPCR runs each of which containing the negative and positive qPCR controls. To limit possible biases due to inter-run  $C_t$  differences in subsequent statistical analyses, all samples that were included in our analyses were processed on the same first qPCR run.

The qPCRs reactions were performed using the Takyon™ No ROX SYBR® kit (Eurogentec) in a total volume of 10 μl, containing 2.5 μl of undiluted template DNA, 5 μl of MasterMix 2X (final concentration = 1X), and 2.5 μl of 10 μM primer mix (final concentration = 0.2 μM). The qPCR program was set as follow: 95°C for 3 min followed by 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, using a LightCycler®480 qPCR device. The resulting fluorescence signals were analyzed using the LightCycler®480 software v1.5.0. A signal was considered positive (i.e., with the presence of *B. truncatus* DNA) if the melting peak obtained for the sample displayed a melting temperature comprised between 79 and 82°C as defined by the classical melting curve obtained for the PCR positive control used in all qPCR runs (i.e., a 0.15 ng/μl DNA extract from a *B. truncatus* individual). Finally, we considered that eDNA from *B. truncatus* was present on a filtering membrane if two qPCR replicates from the same membrane section (i.e., at least 1 section fully positive) displayed a melting curve specific to *B. truncatus*.

Finally, the eDNA signal of *B. truncatus* obtained in qPCR was validated on a subset of 20 membranes section. Sequences from these qPCR products were obtained using ABI 3730xl sequencer at the GenoScreen platform (Montpellier, France).

### 2.3.2 | Droplet digital PCR approach

Because ddPCR is highly sensitive and because it is supposed to be robust even in the potential presence of PCR inhibitors, the ddPCR reactions were ran on pools of DNA extracts from the four sections of each membrane. Noteworthy, this pooling strategy was also tested in our qPCR analyses but failed to provide repeatable results. The ddPCRs were ran using the TaqMan chemistry on a QX200 AutoDG Droplet Digital System (Bio-Rad) at the I.A.G.E. platform (Montpellier, France). More specifically, we amplified a 165 bp region of the *cox1* gene using the Btco2F (5' ATTTTGACTTTTACCACCAT 3') and



Btco2R (5' GATATCCCAGCTAAATGAAG 3') primers and using the FAM-labeled Btco2P probe (5' TCGAAGGAGGGTTGGAACAGG-FAM 3') specific to *B. truncatus* in the ddPCR reactions. These primers and probe were generated on a consensus sequence of *B. truncatus* obtained from the same sequence file used as a template for the design of qPCR primers (i.e., alignment of 210 *B. truncatus* *cox1* sequences downloaded from the NCBI). Then, the best primers and probe combination were selected through melting temperature comparison and BLAST analyses against online databases and a local sequence file containing 108 *cox1* sequences of other freshwater snail species. The specificity of the developed primers and probe complex was next tested using the same mollusk DNA templates as those used for testing the specificity of the qPCR Btco1 primers, that is, individual ddPCR reactions were run on four equimolar pools, two of them containing pooled DNA of 3 *B. truncatus* sister species including and excluding *B. truncatus* DNA, the two others containing pooled DNA from endemic freshwater snail species of Corsica (Table 2) with and without *B. truncatus* DNA. According to the results from this test of specificity, only the primers and probe complex mentioned above showed a perfect specificity to *B. truncatus* and was selected for the ensuing experiments. Individual ddPCR reactions were performed on all membranes including negative controls as well as on the same positive control as for qPCR in a final volume of 20 µl containing 9 µl of template DNA. The resulting fluorescence signals were analyzed using QuantaSoft™ software v1.7. (BioRad). A signal was considered positive (i.e., with the presence of *B. truncatus* DNA) if (a) at least one positive droplet was detected and (b) the positive droplet displayed the same order of fluorescence magnitude as the positives droplets obtained for a ddPCR positive control. Finally, we considered that eDNA from *B. truncatus* was present on a filtering membrane if at least one positive droplet met the above criteria.

From the results obtained using the ddPCR approach, the number of *B. truncatus* eDNA copies per liter (c/L) of filtered water for each sample (i.e., each membrane) was estimated using the following equation (Agersnap et al., 2017; Rusch et al., 2018):

$$C_L = \frac{\frac{C_{dd}}{0.9} * \frac{V_e}{V_r}}{V_w}$$

With  $C_L$ : the number of eDNA c/L for the amplified sample;  $C_{dd}$ : the copy number per reaction volume (c/20 µl) and applying a 10% correction of losses during droplet generation;  $V_e$ : the total volume of eluted DNA after extraction;  $V_r$ : the volume of extracted DNA used for ddPCR reaction; and  $V_w$ : the total volume of filtered water (Agersnap et al., 2017).

## 2.4 | Data analysis

Several factors can influence the concentrations of eDNA isolated from environmental samples including the sampling protocols used (Dickie et al., 2018; Li, Lawson Handley, Read, & Hanfling, 2018) and the local abundance of the targeted species, the latter factor being

linked to the temporal demographic fluctuations of natural populations (Wilcox et al., 2018). With these considerations in mind, we statistically defined the most suitable conditions for optimizing the eDNA detection following our filtration protocol. To this end, we ran several generalized linear models (GLM) to infer the effect of the volume of filtered water (vol), the sampling position (pos), and the local density of *B. truncatus* (dens) on eDNA yielding, that is, cycle threshold values ( $C_t$ ) obtained in qPCR and log-transformed c/L obtained in ddPCR. We also accounted for possible interactions between these variables in our models. The most parsimonious model for explaining c/L and  $C_t$  were selected based on the Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1974; Burnham & Anderson, 2003; Buxton, Groombridge, & Griffiths, 2017). When several models were equally supported (i.e.,  $\Delta AIC < 2$ ; Burnham & Anderson, 2003), we retained the model containing the lowest number of parameters. All GLMs were generated using the function glm implemented in R 3.4.3 using Rstudio 1.1.383 interface (RStudio, 2016).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Sampling sites

The environmental conditions (e.g., temperature, pH) were very similar among the sampling sites. Likewise, all sites presented human activities (generally bathing) except the control site that is inaccessible to the public. The water flow varied from one site to another, ranging from 0.1 m/s for the site WI to 1 m/s for the site MB; these data are displayed in Table 1.

### 3.2 | Development of qPCR primers

Among all the primer pairs tested, Btco1F (5' TYGAAGGAG GGGTTGGAACA 3') coupled with Btco1R (5' RKTRATTCC TGGTGCYCGT 3') provided the best results regarding the qPCR specificity tests (i.e., only the DNA from *B. truncatus* or pooled DNA containing *B. truncatus* DNA were positive in qPCR) and were thus used for subsequent qPCR analyses. This primer pair resulted in the amplification of a 179 bp amplicon specific to *B. truncatus*.

### 3.3 | Molecular analyses

#### 3.3.1 | Quantitative PCR approach

Based on the result obtained from the qPCR approach and according to our validation criteria, DNA from *B. truncatus* was detected from a total of 35 among the 44 field membranes analyzed (79.5%) at sites MB, AT, 3P, and UR. No *B. truncatus* DNA was detected in the water samples collected from the WI site which confirms our previous environmental diagnostic through visual inspections at this site. No *B. truncatus* DNA was detected in our negative control site



(i.e., University channel) or in the 6 field negative controls (i.e., spring water filtered at each sampling site). Noteworthy, two among the total of 48 field negative control replicates showed a measurable  $C_t$  value (Site UR: 37.39 and Site MB: 39.17). However, these two samples displayed unspecific melting curves compared to those obtained from positive controls. Likewise, none of our 6 qPCR negative controls showed a measurable  $C_t$  value. These results indicate that DNA contamination during the overall process from water sampling to qPCR reactions is very unlikely.

The water samples filtered on the river shore and in the streambed provided similar results, that is, 85.7% [18/21] of positive samples at the shore and 81% [17/21] at the streambed location (Figure 1). However, we observed a slight tendency in the  $C_t$  values to be higher for samples filtered in the river shore ( $35.67$ ;  $SD \pm 1.79 C_t$ ) than those filtered in the river streambed ( $37.71$ ;  $SD \pm 1.69 C_t$ ). The median  $C_t$  value for all eDNA samples was  $35.2$ ;  $SD \pm 1.7$ , ranging from  $32.3$  to  $38.84$ . Moreover, our sequencing validation step confirmed that the amplified DNA fragments during qPCR belonged to *B. truncatus* with a pairwise identity ranging from 97.52% to 100% and with a coverage of 97% to the matching sequences (NCBI accession number: MG407340.1 and MG407341.1).

### 3.3.2 | Droplet digital PCR approach

The ddPCR provided the same results to those obtained using the qPCR approach. DNA extracts from the filtered membranes obtained from sites MB, AT, 3P, and UR were positive to *B. truncatus* DNA (79.5%, 35/44 membranes) using ddPCR (i.e., at least one positive droplet presenting the same fluorescence amplitude as the DNA control was detected). Eighteen of the twenty-one filtration achieved on the river shore were positive to *B. truncatus* DNA (i.e., 85.7%), and 17/21 (i.e., 81%) filtration achieved on the streambed of the river were positive (Figure 2). No positive droplet was detected for the two ddPCR negative controls, for the six field negative controls, and for samples collected at site WI. The estimated number of DNA copies per ddPCR reaction volume ranged from  $1.27$  c/20  $\mu$ l to  $42.82$  c/20  $\mu$ l with a median value of  $9.14$  c/20  $\mu$ l;  $SD \pm 9.61$  c/20  $\mu$ l. The median number of DNA copies per liter of filtered water was  $550.15$  c/L;  $SD \pm 610.21$  c/L.

The lowest sensitivity threshold estimated from the ddPCR analyses (i.e., the lowest eDNA concentration detected in our samples) was  $0.06$  c/ $\mu$ l which represents approximately 60 c/ml of filtered water.

### 3.4 | Statistical analyses

Among all GLMs performed using the qPCR dataset, the best-supported model was the following:  $C_t \sim \text{volume} + \text{position} + \text{density}$  (Table 3). According to this model, the snail density ( $p < .001$ ) and the volume of filtered water ( $p < .01$ ; see Table 3 and Figure 3) significantly affect the  $C_t$  values obtained by qPCR after molecular process.

Accordingly, a higher water volume and a higher mollusk density decrease the  $C_t$  value obtained which means that the concentration of *B. truncatus* eDNA is higher for these samples. A significant positive effect of the sampling position (shore) was also found ( $p < .05$ ; Table 3), hence indicating that the  $C_t$  value obtained by qPCR tends to be higher and thus eDNA concentration is lower in water samples collected on the river shore compared to the streambed.

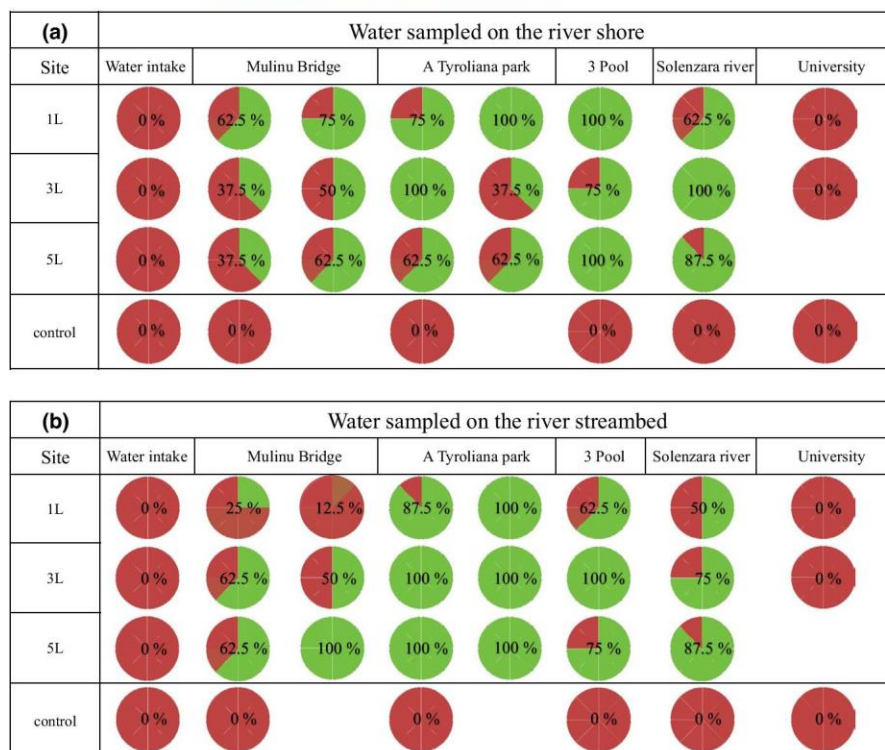
Concerning the ddPCR dataset, the best-supported model explaining c/L predicted a single positive effect of the *B. truncatus* densities ( $p < .001$ ; Table 3). This result indicates that a higher mollusk density results in a higher eDNA concentration which is congruent with our expectations (Figure 4).

## 4 | DISCUSSION

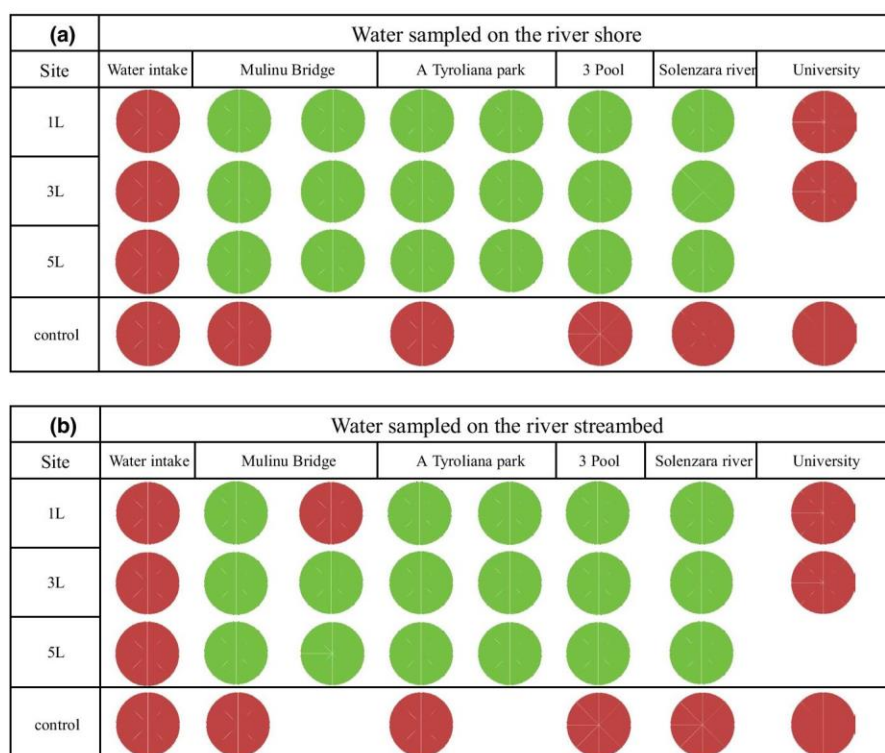
Under the current global change context, it is essential to develop large-scale monitoring tools to understand and predict the dynamics and epidemiology of emerging diseases (Ellwanger et al., 2019). In this study, we present the first application of two eDNA-based methods, namely a ddPCR- and a qPCR-based protocols, to detect environmental DNA of *B. truncatus*, an intermediate host of *S. haematobium*, in natural rivers. Indeed, we were able to detect the presence of *B. truncatus* from water samples collected at four natural transmission sites previously reported in Corsica (Ramalli et al., 2018), while no *B. truncatus* eDNA was detected in sites where this species had never been visually reported before. The sensitivity of our two protocols reached 100% (assessed in silico and in vitro) when using 3 or 5 L of water during filtration but dropped to 91.7% when filtrating 1 L of water using both qPCR and ddPCR. This result indicates that according to our results, at least 3 L of water is necessary to reach an optimal sensitivity whatever the density of mollusks at the sampling site.

More specifically, the sampling procedure that provides the best detection rate consists of a 5-liter filtration preferentially in the river streambed. Whatever the PCR technology used, we can argue that in this current version our protocols designed for water collection, sample preservation, and eDNA extraction are robust. The considerations of these three protocol aspects are critical for establishing a reliable eDNA-based approach (Goldberg et al., 2016) but are generally neglected in most publications. Only 5% of eDNA-based studies provided critical aspects of their sampling protocols (Dickie et al., 2018) and most eDNA studies suffer from a lack of reproducibility especially when their protocols are applied in natural environments for the first time (Tsuji et al., 2019). Finally, no standardized method for eDNA sampling is available so far (Tsuji et al., 2019). This technical lack raises the necessity of further studies benchmarking all existing sampling protocols in an attempt to define standardized sampling pipelines adapted to different environments and environmental samples (i.e., water, sediment, and air).

In this line, several aspects could be developed to improve our eDNA-based monitoring tools (Dickie et al., 2018). First, the robustness of our protocols should be validated in different freshwater



**FIGURE 1** Membranes positiveness obtained from the quantitative PCR approach. The displayed percentage is calculated on the 8 qPCR replicates from the samples filtered on the river shore (a) and at the river streambed (b). Membranes are considered positive if at least two replicates from the same membrane section are positive



**FIGURE 2** Membranes positiveness obtained from the droplet digital PCR approach. All positive membranes from the samples filtered on the river shore (a) and at the river streambed (b) are displayed in green. A membrane is considered positive if at least one positive PCR reaction compliant with the fluorescent signal from the DNA control is detected

environments with different hydrodynamic profiles. In the present study, all of the prospected sites, but the negative University channel site, presented a lotic hydrodynamism (i.e., flowing water) and whether the sampling strategy developed in this study could be applied in lentic environments (i.e., still freshwater) still needs to be assessed. Lentic environments are known to present some specific characteristics that can influence the eDNA decay (e.g.,

temperature, sunlight, and pH; Klobucar, Torrey, & Phaedra, 2017; Strickler, Fremier, & Goldberg, 2015). They also generally contain significantly more suspended solids (Takahara, Minamoto, Yamanaka, Doi, & Kawabata, 2012), which could increase the PCR inhibitors concentration in eDNA samples. Second, the ergonomic aspect and efficiency of our sampling tools could be further optimized. For instance, filtration units are voluminous and are probably

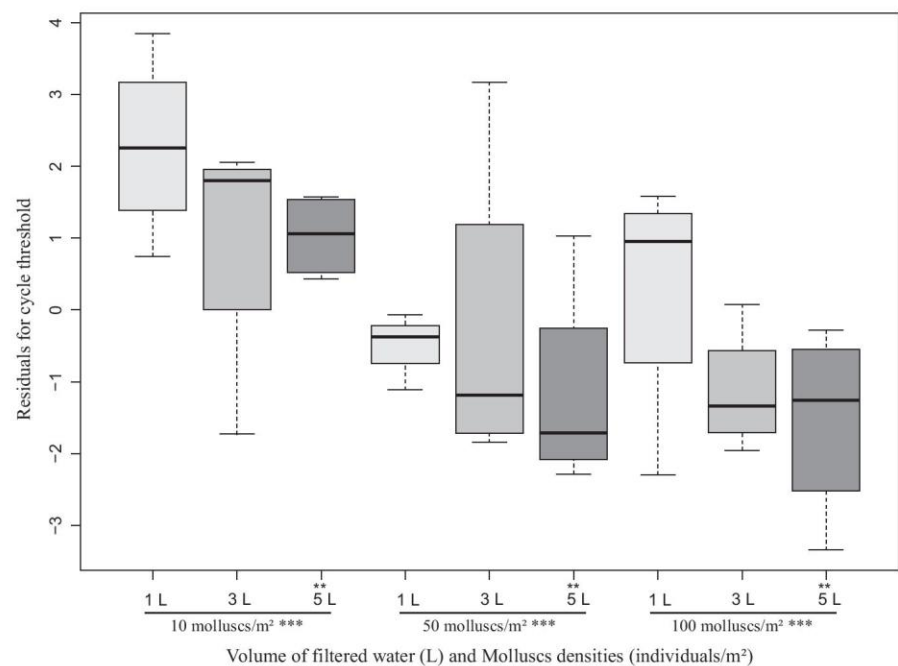


**TABLE 3** Best fitted GLM models that explain ( $C_t$ )s and ( $c/L$ )s obtained by qPCR and ddPCR based on the AIC criterion and number of parameters (nPars) (a) and the parameter estimates obtained from the chosen models

| (a)                               |           |          |         |          |
|-----------------------------------|-----------|----------|---------|----------|
| GLM models                        | nPars     | AIC      | ΔAIC    | Platform |
| C <sub>t</sub> ~ vol + pos + dens | 5         | 134.92   | 0       | qPCR     |
| C <sub>t</sub> ~ vol * pos + dens | 6         | 134.94   | 0.02    |          |
| C <sub>t</sub> ~ dens             | 3         | 135.94   | 1       |          |
| C <sub>t</sub> ~ vol + dens       | 4         | 136.07   | 1.13    |          |
| c/L ~ dens                        | 3         | 106.11   | 0       | ddPCR    |
| c/L ~ pos + dens                  | 4         | 108.08   | 1.97    |          |
| (b)                               |           |          |         |          |
| Variable                          | Estimate  | SE       | z-value | p-value  |
| qPCR                              |           |          |         |          |
| Intercept                         | 36.685959 | 0.446015 | 82.253  | <2e-16   |
| 3 L                               | −0.764357 | 0.418130 | −1.828  | .06754   |
| 5 L                               | −1.181857 | 0.418130 | −2.827  | .00471   |
| Shore                             | 0.861609  | 0.338734 | 2.544   | .01097   |
| Density                           | −0.022992 | 0.004628 | −4.968  | 6.76e-07 |
| ddPCR                             |           |          |         |          |
| Intercept                         | 4.800520  | 0.303499 | 15.817  | <2e-16   |
| Density                           | 0.017062  | 0.004619 | 3.694   | .00022   |

inappropriate when field conditions are difficult (e.g., isolated prospecting sites; long fieldwork). The size-reduction of filtration devices could also be contemplated, for instance using smaller membrane holders coupled with a vacuum automated pump, although the latter could also be a limitation in some field conditions. Likewise, the use of silicate micro-beads (Wilcox et al., 2018) or dried membranes (Balint et al., 2018) could be more convenient than Longmire

solution for sample preservation although this would need to be validated. In terms of eDNA capture, the previous studies benchmarking different filtration membrane composition found that nitrate cellulose membranes (NC) coupled with DNA extraction with DNeasy® Blood & Tissue Kit provide higher eDNA yielding (Hinlo et al., 2017), these findings could also constitute relevant improvement to consider.



**FIGURE 3** Representation of the estimated qPCR cycle thresholds (residuals) as a function of the volume of filtered water and the *B. truncatus* densities at the sampling sites. \*\* and \*\*\* represent differences with significant levels below 0.01 and 0.001 respectively

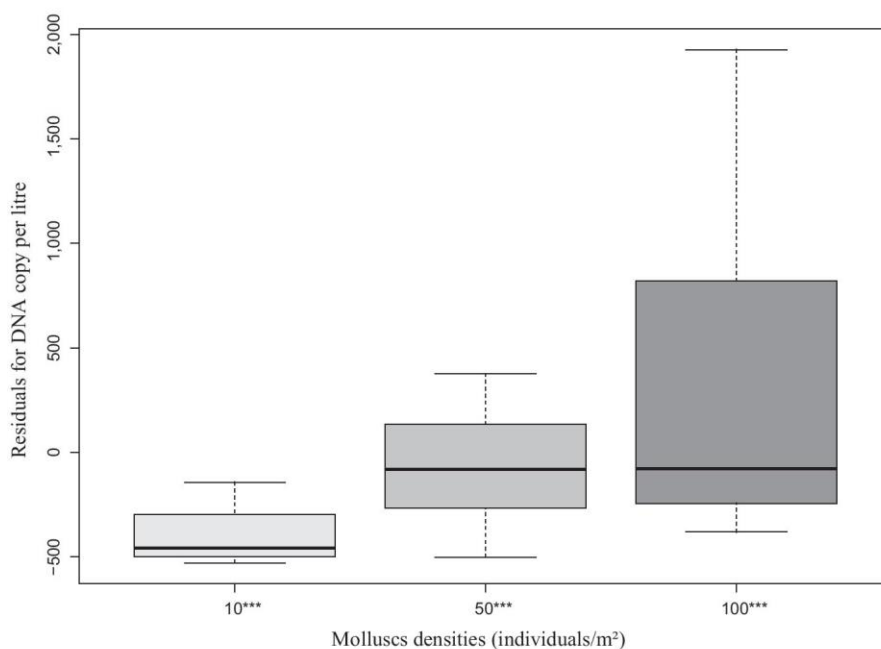
Another major finding of this study is the potential of the ddPCR as an alternative quantification platform to the qPCR for environmental samples. In our study, qPCR and ddPCR gave strictly the same results regarding sensitivity since the same samples were found positive whatever the technology used. The only difference between these two PCR technologies is that ddPCR was able to provide reliable results on the pooled samples while qPCR did not. This result hence provides a small advantage of ddPCR compared to qPCR because it requires less replicates to give reliable results. Finally, because we did not conduct comparative analyses using qPCR and ddPCR on the same dilution standards, it is difficult to conclude on the most accurate technology regarding absolute quantification of environmental DNA and ultimately mollusk density in the field. Thus, based on our results and because ddPCR is generally argued as very sensitive and accurate even for the amplification of low quality DNA samples (e.g., high amount of inhibitors and/or untargeted DNA; Hindson et al., 2011; Taylor et al., 2017), we predict that the ddPCR will be increasingly used for detecting eDNA in the next few years.

The financial aspect of these protocols is also an important consideration for the development of large-scale monitoring tools. To this end, we investigated and compared the prices and time cost between the three approaches for monitoring *B. truncatus* presented in this paper (i.e., qPCR, ddPCR and visual prospecting), following the same method as in (Sengupta et al., 2019). The estimated prices for each site included the reusable materials (e.g., forceps, DNA primers, and probe), meaning that these prices are applicable for a first-time application of the protocol but should be devaluated in subsequent applications (Table S1). As expected, traditional visual survey remains the most economic approach (i.e., ≈20 EUR for all prospected sites; 12 hr/8 sites; Table S1). However, this approach is not adapted for large-scale monitoring as they require extensive workforce proportional to the number of prospected sites and huge malacological knowledge. Regarding the two eDNA-based methods developed in

this study, we estimated that the price between the two PCR technologies differed by 5 EUR (i.e., ≈60 EUR/sites; 6 hr/5 L × 8 sites for qPCR and ≈65 EUR/sites; 5h20/5 L × 8 sites for ddPCR; Table S1). Importantly, however, the estimation for ddPCR included service delivery. When estimating the price of ddPCR if realized in our laboratory facilities, prices are expected to be similar or even less expensive than qPCR analysis in a recurrent use framework. Expenditures related to ddPCR apparatus acquisition, which is much more expensive than those for qPCR, could be the only limiting aspect of this technology (Doi, Uchii, et al., 2015). However, this expense is compensated by the ability to obtain an absolute quantification from a single reaction compared with qPCR. Hence as denoted in the previous studies, ddPCR technology would be an interesting alternative to qPCR in quantifying eDNA from environmental samples as this enables absolute quantification from a single sample and due to the inhibitors dilutions during the sample singulation step (Doi, Uchii, et al., 2015).

In a schistosomiasis prevention perspective, these two eDNA-based approaches constitute promising tools for assessing the current distribution of *B. truncatus* from water samples collected in the field, and hence to identify new environments where schistosomiasis could emerge within and outside its endemic zone. In this regard, tropical schistosomes were recently found to be preadapted to temperate temperatures (Mulero, Rey, Arancibia, Mas-Coma, & Boissier, 2019), meaning that the spread of urogenital schistosomiasis northward mainly relies on the presence of locally adapted and compatible *B. truncatus* populations as those established in Corsica (Doby, Rault, Deblock, & Chabaud, 1966; Ramalli et al., 2018) in Spain and Portugal (Martínez-Ortí, Vilavella, Bargues, & Mas-Coma, 2019). In this context, we believe that these developed tools will help better assessing the risk of schistosomiasis emergence worldwide.

Importantly however, other factors need to be accounted to establish efficient risk maps of emergence and spread of schistosomiasis at large scale, which include human population movements,



**FIGURE 4** Representation of the estimated *B. truncatus* DNA copy per liters of filtered water estimated using ddPCR as a function of *B. truncatus* densities at the sampling sites. \*\*\* represent differences with significant levels below 0.001



the spatial fluctuation of schistosomes' intermediate hosts under current climate changes, the invasion ability of African schistosomes species, the effect of hybridization between schistosome species on the invasion ability of the parasite, and finally the susceptibility of other European freshwater snails' species to *Schistosoma* parasites (Kincaid-Smith et al., 2017). To this end, the combination of eDNA-based tools with spatial modeling approaches such as ecological niche modeling (ENM) would improve our ability to generate "real-time" risk maps of schistosomiasis in Europe and endemic countries (Kincaid-Smith et al., 2017). ENM approaches were already used for spatial monitoring of freshwater snail species involved in SBD transmission such as fascioliasis and schistosomiasis (Cordellier & Pfenninger, 2009; Pedersen et al., 2014). Therefore, the use of ENM modeling approaches coupled with eDNA-diagnosis tools appears to be a next development step for SBD risk assessment endeavors.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (PNREST 2019/1/059 Molrisk), the ANR (Program HySWARM ANR-18-CE35-0001), and the Occitania region (MOLRISK). This study is set within the framework of the "Laboratoires d'Excellences (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41). Thank you to Franz Durandet and Maxime Juvin from Genome Editing engineering and analytics (I.A.G.E) who carried out the ddPCR experiments and subsequent first step analysis. We also wish to thank Sebastien Calvignac-Spencer and another anonymous referee for their help in the revision of previous versions of the manuscript. SM is also grateful to Didier Mulero for his help during field work and also the Occitania region for its involvement in this project.

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## AUTHORS CONTRIBUTIONS

OR, JB, and SM conceived the original idea. SM, YQ, JF, and JFA carried out the field sampling. SM carried out the qPCR experiment, I.A.G.E. carried out the ddPCR experiment and first analyses. SM, OR, and JB analyzed and interpreted the data. JPP provided malacological expertise. SM and OR drafted the manuscript. OR, SM, JB, YQ, JF, JFA, and JPP revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## ORCID

Stephen Mulero  <https://orcid.org/0000-0002-0853-0730>

Jérôme Boissier  <https://orcid.org/0000-0002-0793-3108>

Yann Quilichini  <https://orcid.org/0000-0003-0739-0155>

Olivier Rey  <https://orcid.org/0000-0003-4462-3712>

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The dataset supporting the conclusions of this article is included within the article.

## REFERENCES

- Agersnap, S., Larsen, W. B., Knudsen, S. W., Strand, D., Thomsen, P. F., Hesselsoe, M., ... Møller, P. R. (2017). Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS One*, 12(6), e0179261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179261>
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716–723. <https://doi.org/10.1109/tac.1974.1100705>
- Amarir, F., Sebti, F., Abbasi, I., Sadak, A., Fella, H., Nhammi, H., ... Rhajaoui, M. (2014). *Schistosoma haematobium* detection in snails by Dral PCR and Sh110/Sm-SI PCR: Further evidence of the interruption of schistosomiasis transmission in Morocco. *Parasit Vectors*, 7, 288–288. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-288>
- Baker, C. S., Steel, D., Nieukirk, S., & Klinck, H. (2018). Environmental DNA (eDNA) from the wake of the whales: Droplet digital PCR for detection and species identification. *Frontiers in Marine Science*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00133>
- Bálint, M., Nowak, C., Márton, O., Pauls, S. U., Wittwer, C., Aramayo, J. L., ... Jansen, M. (2018). Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1415–1426. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12934>
- Bass, D., Stentiford, G. D., Littlewood, D. T. J., & Hartikainen, H. (2015). Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends in Parasitology*, 31(10), 499–513. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.013>
- Bergquist, R., Zhou, X. N., Rollinson, D., Reinhard-Rupp, J., & Klohe, K. (2017). Elimination of schistosomiasis: The tools required. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0370-7>
- 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), e0006370. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006370>
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., ... de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(6), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
- Boissier, J., Grech-Angelini, S., Webster, B. L., Allienne, J.-F., Huyse, T., Mas-Coma, S., ... Mita, G. (2016). Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): An epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(8), 971–979. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00175-4)
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 176–182. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
- Burnham, K., & Anderson, D. (2003). *Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach* (2nd ed., Vol. 1, p. 488). New-York, NY: Springer Science & Business Media.
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2017). Is the detection of aquatic environmental DNA influenced by substrate type? *PLoS One*, 12(8), e0183371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183371>
- Calata, F. I. C., Caranguian, C. Z., Mendoza, J. E. M., Fornillos, R. J. C., Tabios, I. K. B., Fontanilla, I. K. C., ... Sato, M. O. (2019). Analysis of environmental DNA and edaphic factors for the detection of the snail intermediate host *Oncomelania hupensis* quadrasi. *Pathogens*, 8(4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040160>
- Capinha, C., Essl, F., Seebens, H., Moser, D., & Pereira, H. M. (2015). The dispersal of alien species redefines biogeography in the Anthropocene. *Science*, 348(6240), 1248–1251. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8913>



- Coble, A. A., Flinders, C. A., Homyack, J. A., Penaluna, B. E., Cronn, R. C., & Weitemier, K. (2019). eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications. *Science of the Total Environment*, 649, 1157–1170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.370>
- Cohen, A. J., Brauer, M., Burnett, R., Anderson, H. R., Frostad, J., Estep, K., ... Forouzanfar, M. H. (2017). Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: An analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *The Lancet*, 389(10082), 1907–1918. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30505-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30505-6)
- Collen, B., Whittton, F., Dyer, E. E., Baillie, J. E. M., Cumberlidge, N., Darwall, W. R. T., ... Böhm, M. (2014). Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. *Global Ecology and Biogeography*, 23(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/geb.12096>
- Cordellier, M., & Pfenninger, M. (2009). Inferring the past to predict the future: Climate modelling predictions and phylogeography for the freshwater gastropod *Radix balthica* (Pulmonata, Basommatophora). *Molecular Ecology*, 18(3), 534–544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04042.x>
- Dickie, I. A., Boyer, S., Buckley, H. L., Duncan, R. P., Gardner, P. P., Hogg, I. D., ... Weaver, L. (2018). Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. *Molecular Ecology Resources*, 18(5), 940–952. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12907>
- Doby, J. M., Rault, B., Deblock, S., & Chabaud, A. (1966). Snails and bilharziasis in Corsica. Distribution, frequency and biology of "*Bulinus truncatus*". *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparée*, 41(4), 337–349.
- Doi, H., Takahara, T., Minamoto, T., Matsushashi, S., Uchii, K., & Yamanaka, H. (2015). Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species. *Environmental Science & Technology*, 49(9), 5601–5608. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00253>
- Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys. *PLoS One*, 10(3), e0122763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>
- ECDC (2011). VBORNET, European Network for Arthropod Vector Surveillance for Human Public Health. VBORNET. Retrieved from <http://www.vbornet.eu/>
- ECDC (2014). Guidelines for the surveillance of native mosquitoes in Europe. ECDC, <https://doi.org/10.2900/37227>
- Ellwanger, J. H., Kaminski, V. L., & Chies, J. A. B. (2019). Emerging infectious disease prevention: Where should we invest our resources and efforts? *Journal of Infection and Public Health*, 12(3), 313–316. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.03.010>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., ... Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299–1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12595>
- Gozlan, R. E., St-Hilaire, S., Feist, S. W., Martin, P., & Kent, M. L. (2005). Biodiversity: Disease threat to European fish. *Nature*, 435(7045), 1046. <https://doi.org/10.1038/4351046a>
- Hartikainen, H., Bass, D., Briscoe, A. G., Knipe, H., Green, A. J., & Okamura, B. (2016). Assessing myxozoan presence and diversity using environmental DNA. *International Journal for Parasitology*, 46(12), 781–792. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.006>
- Hashizume, H., Sato, M., Sato, M. O., Ikeda, S., Yoonuan, T., Sanguankiat, S., ... Minamoto, T. (2017). Application of environmental DNA analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in water samples. *Acta Tropica*, 169, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.008>
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Herricks, J. R., Hotez, P. J., Wanga, V., Coffeng, L. E., Haagsma, J. A., Basáñez, M.-G., ... Murray, C. J. L. (2017). The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005424. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005424>
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., & Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS One*, 12(6), e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>
- Holtfreter, M. C., Mone, H., Muller-Stover, I., Mouahid, G., & Richter, J. (2014). Schistosoma haematobium infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Eurosurveillance*, 19(22), 2–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.22.20821>
- Hunter, M. E., Ferrante, J. A., Meigs-Friend, G., & Ulmer, A. (2019). Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques. *Scientific Reports*, 9(1), 5259. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40977-w>
- Hunter, M. E., Meigs-Friend, G., Ferrante, J. A., Smith, B. J., & Hart, K. M. (2019). Efficacy of eDNA as an early detection indicator for Burmese pythons in the ARM Loxahatchee National Wildlife Refuge in the greater Everglades ecosystem. *Ecological Indicators*, 102, 617–622. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.02.058>
- Huwer, J. R., Koprivnikar, J., Johnson, P. T., & Whyard, S. (2015). Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecological Applications*, 25(4), 991–1002. <https://doi.org/10.1890/14-1530.1>
- Jerde, C. L., Olds, B. P., Shogren, A. J., Andruszkiewicz, E. A., Mahon, A. R., Bolster, D., & Tank, J. L. (2016). The influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8770–8779. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01761>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Jones, R. A., Brophy, P. M., Davis, C. N., Davies, T. E., Emberson, H., Rees Stevens, P., & Williams, H. W. (2018). Detection of *Galba truncatula*, *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* environmental DNA within water sources on pasture land, a future tool for fluke control? *Parasit Vectors*, 11(1), 342. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2928-z>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- 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), 299–318. <https://doi.org/10.1080/10590501.2014.941279>
- Kincaid-Smith, J., Rey, O., Toulza, E., Berry, A., & Boissier, J. (2017). Emerging schistosomiasis in Europe: A need to quantify the risks. *Trends Parasitol*, 33(8), 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.009>
- Klobucar, S. L., Torrey, R. W., & Phaedra, B. (2017). At the forefront: Evidence of the applicability of using environmental DNA to quantify the abundance of fish populations in natural lentic waters with additional sampling considerations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 74(12), 2030–2034. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0114>



- Lamy, T., Pointier, J. P., Jarne, P., & David, P. (2012). Testing meta-population dynamics using genetic, demographic and ecological data. *Molecular Ecology*, 21(6), 1394–1410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05478.x>
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Read, D. S., & Hanfling, B. (2018). The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 18(5), 1102–1114. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12899>
- Longmire, J. L., Maltbie, M., & Baker, R. J. (1997). *Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections* (Vol. 163, pp. 1–3). Museum of Texas Tech University. Occasional Papers.
- Martínez-Ortí, A., Vilavella, D., Bagues, M. D., & Mas-Coma, S. (2019). Risk map of transmission of urogenital schistosomiasis by *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) (Mollusca Gastropoda, Bulinidae) in Spain and Portugal. *Animal Biodiversity and Conservation*, 42(2), 257–266. <https://doi.org/10.32800/abc.2019.42.0257>
- Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2013). Emerging infectious diseases: Threats to human health and global stability. *PLoS Pathogens*, 9(7), e1003467. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003467>
- Mulero, S., Rey, O., Arancibia, N., Mas-Coma, S., & Boissier, J. (2019). Persistent establishment of a tropical disease in Europe: The pre-adaptation of schistosomes to overwinter. *Parasites & Vectors*, 12(1), 379. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3635-0>
- Nathan, L. M., Simmons, M., Wegleitner, B. J., Jerde, C. L., & Mahon, A. R. (2014). Quantifying environmental DNA signals for aquatic invasive species across multiple detection platforms. *Environmental Science & Technology*, 48(21), 12800–12806. <https://doi.org/10.1021/es5034052>
- Noël, H., Ruello, M., Maccary, A., Pelat, C., Sommen, C., Boissier, J., ... Berry, A. (2017). Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: Monitoring early signs of endemicization? *Clinical Microbiology and Infection*, 24(3), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.026>
- Parmesan, C., & Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421(6918), 37–42. <https://doi.org/10.1038/nature01286>
- Pedersen, U. B., Stendel, M., Midzi, N., Mduluzi, T., Soko, W., Stensgaard, A.-S., ... Kristensen, T. K. (2014). Modelling climate change impact on the spatial distribution of fresh water snails hosting trematodes in Zimbabwe. *Parasit Vectors*, 7, 536. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0536-0>
- Pereira, H. M., Leadley, P. W., Proença, V., Alkemade, R., Scharlemann, J. P. W., Fernandez-Manjarrés, J. F., ... Walpole, M. (2010). Scenarios for global biodiversity in the 21st century. *Science*, 330(6010), 1496–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1196624>
- Puth, L. M., & Post, D. M. (2005). Studying invasion: Have we missed the boat? *Ecology Letters*, 8(7), 715–721. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00774.x>
- Ramalli, L., Mulero, S., Noël, H., Chiappini, J. D., Vincent, J., Barre-Cardi, H., ... Berry, A. (2018). Persistence of schistosomal transmission linked to the Cava river in southern Corsica since 2013. *Eurosurveillance*, 23(4), 2–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017>
- Rathinasamy, V., Hosking, C., Tran, L., Kelley, J., Williamson, G., Swan, J., ... Spithill, T. W. (2018). Development of a multiplex quantitative PCR assay for detection and quantification of DNA from *Fasciola hepatica* and the intermediate snail host, *Austropelea tomentosa*, in water samples. *Veterinary Parasitology*, 259, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.018>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). bold: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Richards, S. L., Lord, C. C., Pesko, K., & Tabachnick, W. J. (2009). Environmental and biological factors influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) vector competence for Saint Louis encephalitis virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(2), 264–272. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.264>
- Richey, C. A., Kenelty, K. V., Van Stone Hopkins, K., Stevens, B. N., Martinez-Lopez, B., Barnum, S. M., ... Soto, E. (2018). Distribution and prevalence of *Myxobolus cerebralis* in postfire areas of Plumas National Forest: Utility of environmental DNA sampling. *J Aquat Anim Health*, 30(2), 130–143. <https://doi.org/10.1002/aah.10014>
- RStudio Team (2016). *RStudio: Integrated development for R*. RStudio, Inc. Retrieved from <http://www.rstudio.com>
- Rusch, J. C., Hansen, H., Strand, D. A., Markussen, T., Hytterod, S., & Vralstad, T. (2018). Catching the fish with the worm: A case study on eDNA detection of the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasit Vectors*, 11(1), 333. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2916-3>
- Schaffner, F., Bellini, R., Petric, D., Scholte, E. J., Zeller, H., & Rakotoarivony, L. M. (2013). Development of guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. *Parasit Vectors*, 6, 209. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-209>
- Schneider, J., Valentini, A., Dejean, T., Montarsi, F., Taberlet, P., Glaizot, O., & Fumagalli, L. (2016). Detection of invasive mosquito vectors using environmental DNA (eDNA) from water samples. *PLoS One*, 11(9), e0162493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162493>
- Sengupta, M. E., Hellström, M., Kariuki, H. C., Olsen, A., Thomsen, P. F., Mejer, H., ... Vennervald, B. J. (2019). Environmental DNA for improved detection and environmental surveillance of schistosomiasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(18), 8931–8940. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815046116>
- Stensgaard, A. S., Vounatsou, P., Sengupta, M. E., & Utzinger, J. (2019). Schistosomes, snails and climate change: Current trends and future expectations. *Acta Tropica*, 190, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.013>
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 7(4), e35868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>
- Taylor, S. C., Laperriere, G., & Germain, H. (2017). Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep*, 7(1), 2409. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1(2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/edn3.21>
- Uthicke, S., Lamare, M., & Doyle, J. R. (2018). eDNA detection of corallivorous seastar (*Acanthaster cf. solaris*) outbreaks on the Great Barrier Reef using digital droplet PCR. *Coral Reefs*, 37(4), 1229–1239. <https://doi.org/10.1007/s00338-018-1734-6>
- Wacker, S., Fossey, F., Larsen, B. M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., & Karlsson, S. (2019). Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA*, 1(1), 64–73. <https://doi.org/10.1002/edn3.10>
- WHO (2002). *The partnership for parasite control, second meeting*, Rome. 20 February 2018. WHO. Retrieved from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
- WHO (2017). *Vector-borne diseases*. 31 October 2017. WHO, 1. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>



- WHO (2018). *Schistosomiasis*. 27 December 2018. WHO. Retrieved from <https://www.who.int/schistosomiasis/en/>
- Wilcox, T. M., Zarn, K. E., Piggott, M. P., Young, M. K., McKelvey, K. S., & Schwartz, M. K. (2018). Capture enrichment of aquatic environmental DNA: A first proof of concept. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1392–1401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12928>
- Worrell, C., Xiao, N., Vidal, J. E., Chen, L., Zhong, B., & Remais, J. (2011). Field detection of *Schistosoma japonicum* cercariae in environmental water samples by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 2192–2195. <https://doi.org/10.1128/AEM.01561-10>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

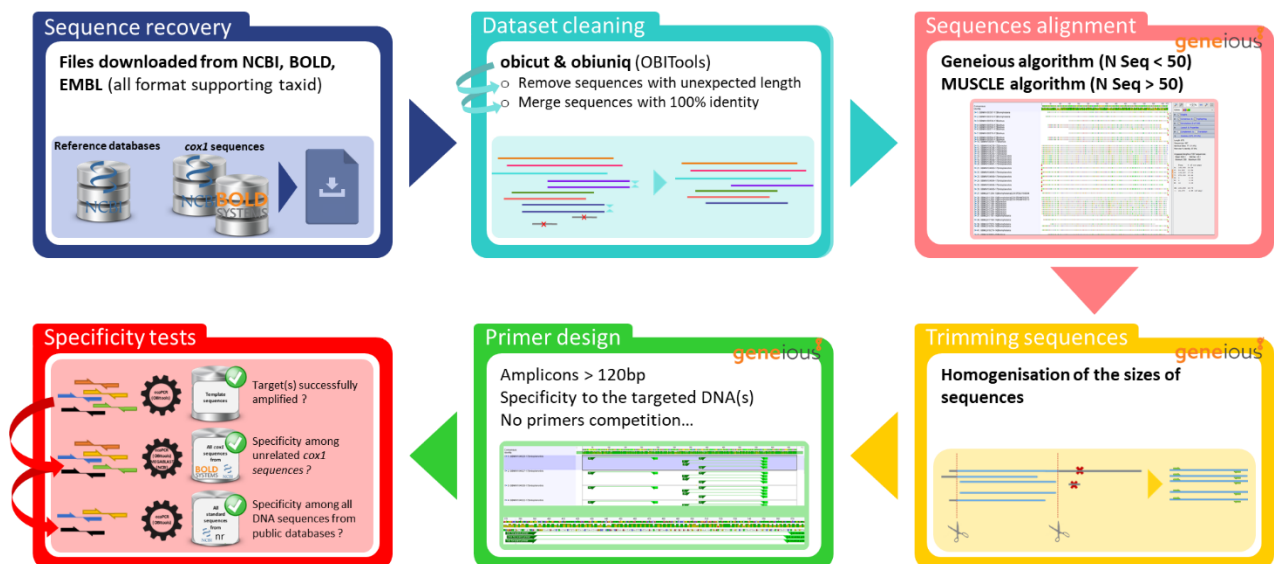
## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Mulero S, Boissier J, Allienne J-F, et al. Environmental DNA for detecting *Bulinus truncatus*: A new environmental surveillance tool for schistosomiasis emergence risk assessment. *Environmental DNA*. 2019;00: 1–14. <https://doi.org/10.1002/edn3.53>

## Supporting information (Publication 3)

(Publication 3) Figure S1. Bioinformatics pipeline used for the design of qPCR primers.



**(Publication 3) Table S2.** Price and time cost comparison between eDNA approach and conventional visual prospecting methods for the detection of *B. truncatus*.

| Method used                                                                                            | eDNA                 |                       | Visual prospecting                 |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------|
|                                                                                                        | qPCR<br>(5 L / site) | ddPCR<br>(5 L / site) | Sustained effort<br>(1 hr / sites) |                    |
| <b>Sampling efforts (man - hours):</b><br>Water filtration<br>Conservation<br><i>Snails collection</i> | 8 x 0.5 hr           | 8 x 0.5 hr            | 8 x 1 hr<br>(≈64 snails, SD ± 37)  | Time cost / 8 site |
| <b>Lab-work:</b><br>Extraction to<br>Results analysis<br><i>Snails identification</i>                  |                      |                       | 8 x 0.5 hr                         |                    |
| <b>Total / 8 sites</b>                                                                                 | <b>6 hr</b>          | <b>5.3 hr</b>         | <b>12 hr</b>                       |                    |
| <b>Sampling materials (€):</b><br>Water filtration<br>Conservation<br><i>Snails collection</i>         | 20 €                 | 20 €                  | 20 €                               | Price / site       |
| <b>Lab-work:</b> DNA extraction and amplification                                                      |                      |                       | 0 €                                |                    |
| <b>Total / sites</b>                                                                                   | <b>60 €</b>          | <b>65 €</b>           | <b>20 € for all sites</b>          |                    |

This comparison was made following the same methods as Sengupta, *et al.*, 2019. We considered the time (in man-hours) and material costs needed per site sampled (including French VAT). The displayed elapsed time coincides with the minimal duration requested to carry out extraction, qPCR/ddPCR and analysis experiments for one sample. However, up to 8 sites can be processed at once in the same DNA extraction, qPCR and ddPCR run, hence, man-hours were estimated for 8 sites. The elapsed time related to DNA extraction lysis (1h) qPCR (1h45) and ddPCR (5h) run were not included as man-hours can be reallocated elsewhere at the same time.

## 2. Détection intramolluscale de trématodes pour l'identification des sites de transmission actifs et potentiels

Dans l'objectif d'améliorer notre capacité à suivre les foyers de bilharziose urogénitale dans l'environnement, nous avons également développé un outil permettant de détecter les sites de transmission actifs et potentiels, si possible avant l'apparition de cas humains, donc de détecter *S. haematobium* dans l'environnement aquatique. Dans le contexte de l'émergence en Corse, le laboratoire IHPE étant un centre collaborateur OMS a été contacté pour développer un outil de diagnostic moléculaire pour détecter *S. haematobium* dans les rivières de Corse, des travaux effectués dans le cadre de mon stage de première année de master qui furent par la suite publiés dans l'article constituant la première partie de ce volet sur les outils de diagnostics intramolluscal de trématodes (Ramalli et al., 2018). Ces travaux ont par la suite donné lieu à une surveillance environnementale annuelle de la bilharziose urogénitale dans les bullins des rivières Cavu et Solenzara (Ramalli et al., 2018). Avant d'en arriver à cet outil de diagnostic, il a fallu regarder ce qui se faisait dans la littérature scientifique en ce qui concerne la détection de trématodes dans l'environnement. À l'époque les méthodes les plus employées en particulier pour les schistosomes demeuraient l'émission cercarienne : des mollusques sont collectés sur le terrain puis mis à émettre en laboratoire à la suite d'une exposition à un stimulus lumineux, après quoi les cercaires sont identifiées sous loupe binoculaire, cette méthode a été employée en Corse en 2014 et 2015 (Boissier et al., 2016). Il existait également une autre méthode directement applicable en milieux naturels à savoir la cercariométrie, soit le comptage de cercaires à partir d'eau filtrée directement *in natura* (Theron, 1979b), ces dernières étant retenues par un dispositif de tamis et de filtres successifs permettant d'isoler les organismes et particules de taille équivalente à celle des cercaires.

En ce qui concerne l'ADNe, les efforts de recherches menés dans le domaine de la détection de trématodes dans l'environnement ont été largement plus importants que ceux déployés pour la détection de mollusques d'eau douce dans l'environnement (Mulero, Boissier, et al., 2020). En effet, c'est pendant ces dernières années que s'est accéléré le développement d'outils de diagnostics ADNe ciblés, **Figure 10**, essentiellement à partir de prélèvement d'eau, notamment pour des trématodes du genre *Trichobilharzia* responsable des dermatites du nageur (Rudko, Turnbull, Reimink, Froelich, & Hanington, 2019), *F. hepatica*

et *Calicophoron daubneyi* respectivement responsable de la fasciolose et de la paramphistomose (Jones et al., 2018), *Opisthorchis viverrini* responsable de l'opisthorchiase (Hashizume et al., 2017) et plus récemment plusieurs outils pour la détection de schistosomes responsables de la bilharziose sino-japonaise (*i.e.* *S. japonicum* ; Fornillos et al., 2019), et des bilharzioses uro-génitales et méésentériques (*i.e.* *S. haematobium* et *S. mansoni* ; Alzaylaee, Collins, Rinaldi, et al., 2020). Cependant, comme pour les diagnostics ADNe de détection de mollusques d'eau douce dans l'environnement aquatique, ces outils vont encore nécessiter des validations sur une grande diversité d'environnements naturels pour s'assurer de leur fiabilité *in natura* (Alzaylaee, Collins, Shechonge, et al., 2020), principalement en raison des faibles prévalences naturelles retrouvées dans les populations de mollusques pour certains trématodes comme les schistosomes (Basch, 1991). Conscient de ces limitations et dans l'objectif d'aboutir rapidement à un outil diagnostique applicable pour une prospection annuelle de bilharziose urogénitale dans les rivières de Corse, nous avons choisis de développer des outils de diagnostics environnementaux pour la détection intramolluscale de trématodes en commençant par *S. haematobium*. Cette approche diminue partiellement les risques de faux positifs rencontrés avec les outils de diagnostics ADNe à partir d'échantillons collectés directement dans l'environnement (Alzaylaee, Collins, Shechonge, et al., 2020), mais nécessite un effort d'échantillonnage de mollusques important (Ramalli et al., 2018). Il est à noter qu'en parasitologie, ce type d'outil peut également être qualifié de diagnostic ADNe étant donné que l'environnement dans lequel l'ADN libre est isolé peut faire référence à une matrice organique, ici le mollusque hôte (Bass et al., 2015), bien que la majeure partie de l'ADN récupérée provienne du parasite lui-même.



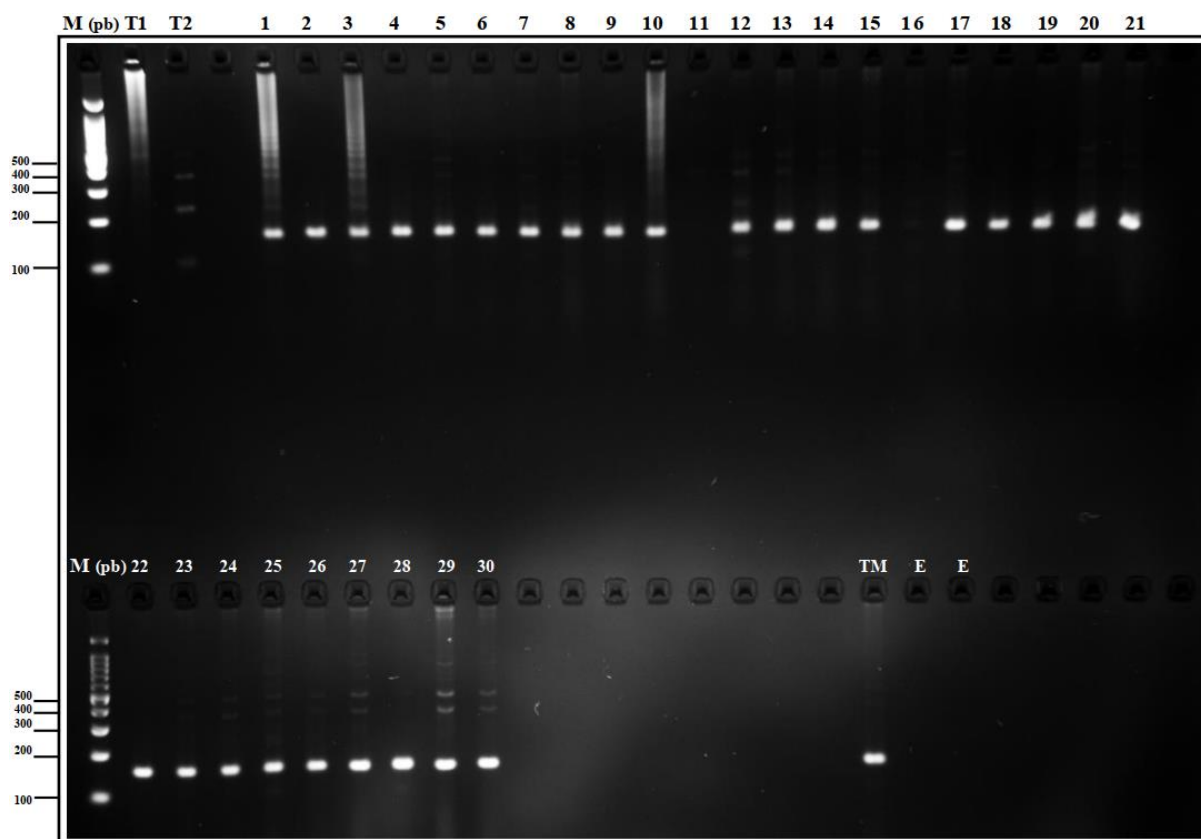
### a. Détection ciblée de *Schistosoma haematobium* dans son hôte mollusque, le diagnostic Dral-PCR

- **Publication 4** : Ramalli, L. ; **Mulero, S.** ; Noël, H. ; Chiappini, JD. ; Vincent, J. ; Barré-Cardi, H. ; Malfait, P. ; Normand, G. ; Busato, F. ; Gendrin, V. ; Allienne, JF. ; Fillaux, J. ; Boissier, J. ; Berry, A. (2018). Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in southern Corsica since 2013. *Eurosurveillance*, 23(4): 2. Doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017

À la suite de l'épidémie de bilharziose urogénitale de 2013 en Corse, l'action collective de prévention et de contrôle lancée à échelle européenne par plusieurs institutions a permis l'identification de centaines de cas de bilharziose urogénitale acquis en Corse après le dépistage de 37 000 personnes entre 2014 et 2015 (Boissier, Kincaid-Smith, et al., 2015), et a permis d'avancer des preuves solides que la transmission du parasite en Corse était devenue permanente (Berry et al., 2016). Ce contexte alarmant a soulevé la nécessité de s'intéresser à la dynamique du parasite dans l'environnement pour limiter la transmission à l'Homme (Boissier et al., 2016). L'un des aspects de ce programme était donc de développer un outil moléculaire pour identifier *S. haematobium* directement dans l'environnement, car les données sur la distribution de ce parasite reposent principalement sur des études épidémiologiques localisées basées sur des données de prévalences et d'intensités parasitaires issues du dépistage de personnes ou animaux infectés (Keiser & Utzinger, 2009; Kincaid-Smith et al., 2017).

Pour augmenter nos chances de trouver un mollusque infecté, même s'il s'agit d'infections précoces ou avortées, nous nous sommes basés sur des études antérieures de développement d'outils de diagnostics moléculaires par PCR ou qPCR pour amplifier l'ADN de schistosomes dans des échantillons humains (e.g. urine, fèces, sérum ou plasma ; Ibironke, Phillips, Garba, Lamine, and Shiff, 2011; Cnops, Soentjens, Clerinx, and Van Esbroeck, 2013). Des approches moléculaires principalement basées sur l'amplification de séquences d'ADN répétées et hautement conservées au sein d'une même espèce ou groupe d'espèces (Hamburger, Turetski, Kapeller, & Deresiewicz, 1991; Hamburger et al., 2001; Abbasi et al., 2012) que nous avons cherché à adapter à un diagnostic intramolluscal sur *B. truncatus*. Concernant *S. haematobium*, nous avons donc opté pour la séquence Dral, une séquence

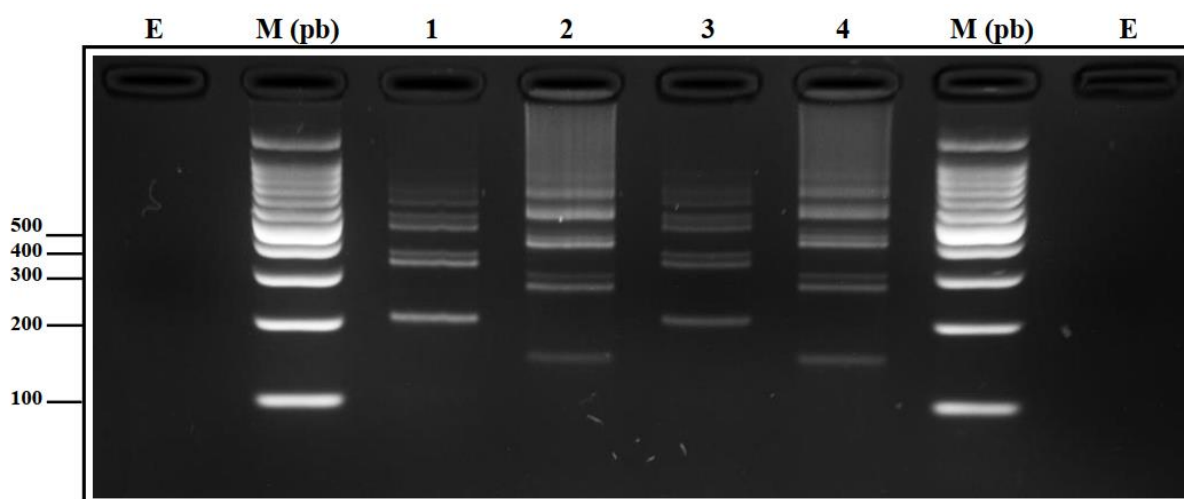
répétée en tandem de 121 paires de bases (pb) spécifique au groupe *haematobium* et précédemment décrite (Hamburger et al., 2001), **figure 14**.



**Figure 14. Résultats d'un test en aveugle réalisé sur l'ADN extrait de 30 *B. truncatus* par amplification Dral (Groupe *Haematobium*) - *cox1* (*B. truncatus*), visualisée sur un gel d'agarose 3% coloré au bromure d'éthidium.** M (pb) : Marqueur de taille 100 pb. E : Contrôles négatifs eau. T1 : ADN non dilué d'un miracidium de *S. haematobium*. T2 : ADN dilué au 500 000<sup>e</sup> du même miracidium. TM : Contrôle interne de PCR, ADN de *B. truncatus* dilué au 20<sup>e</sup>. Puits 1 à 30 : ADN dilué au 20<sup>e</sup> des 30 *B. truncatus* diagnostiqués. Nous constatons que les individus 1, 3 et 10 présentant un « smear » en plus du signal de *B. truncatus* sont les individus qui ont été mis en présence d'un miracidium de *S. haematobium*, des résultats confirmés par l'expérimentateur ayant préparé les mollusques non exposés et exposés, Jérôme Boissier).

Cette séquence répétée est également présente chez *S. bovis* qui fait partie du groupe *haematobium* (Hamburger et al., 2001), ainsi les souches hybrides entre cette espèce et *S. haematobium* peuvent être détectées de manière indifférenciée avec ce même marqueur. En plus de la séquence Dral, nous avons également amplifié en multiplexe une portion de 148 pb du gène mitochondrial *Cox1* de *B. truncatus*, un contrôle interne de PCR permettant de confirmer que le mollusque analysé est *B. truncatus* et permettant de s'assurer du fonctionnement de la réaction de PCR en l'absence du signal de la séquence Dral. Avec ce

multiplexe nous avons également développé un second test amplifiant cette fois-ci la séquence sh73-Dral (une autre séquence répétée qui s'intercale entre chaque répétition de Dral ; Abbasi et al., 2012), et qui permet de différencier *S. haematobium* de *S. bovis*, par différence de taille de séquences, **figure 15**. Cet outil a été développé dans le cadre de mon stage de master 1 et est utilisé chaque année depuis 2016 pour détecter la présence potentielle de *S. haematobium* dans les bullins du Cavu et de la Solenzara. Les résultats obtenus lors des diagnostics environnementaux réalisés entre 2016 et 2019 n'ont révélés aucune trace de la présence de parasite malgré l'analyse de 18 926 mollusques. Ces résultats ont été publiés dans un article faisant un état des lieux des cas de bilharzioses identifiés en Corse depuis 2015, et qui ont permis de poser les bases de travail pour les études menées sur la préadaptation du parasite aux climats tempérés (Mulero et al., 2019) et sur le rôle des hôtes réservoirs dans cette persistance (Oleaga et al., 2019).



**Figure 15. Différenciation de *S. haematobium* x *bovis* et de *S. bovis* par PCR Sh73-Dral.** M : marqueur de taille. E : contrôle négatif eau. Puits 1 et 3 : ADN de vers adultes *S. haematobium* x *bovis*. Puits 2 et 4 : ADN de vers adultes *S. bovis*. Visualisé par électrophorèse en gel d'agarose 3%.

# Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in southern Corsica since 2013

Lauriane Ramalli<sup>1,2,3</sup>, Stephen Mulero<sup>3,4</sup>, Harold Noël<sup>5</sup>, Jean-Dominique Chiappini<sup>6</sup>, Josselin Vincent<sup>6</sup>, Hélène Barré-Cardi<sup>7</sup>, Philippe Malfait<sup>8</sup>, Guillaume Normand<sup>8</sup>, Florian Busato<sup>9</sup>, Vincent Gendrin<sup>10</sup>, Jean-François Allienne<sup>4</sup>, Judith Fillaux<sup>11</sup>, Jérôme Boissier<sup>4,12</sup>, Antoine Berry<sup>11,12,13</sup>

1. Santé publique France, Regional office of the French national public health agency in Provence-Alpes-Côte d'Azur and Corsica, Saint-Maurice, France
2. European Programme for Intervention Epidemiology Training (EPIET), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden
3. Both authors contributed equally to the study and manuscript writing
4. French National Centre for Scientific Research (CNRS) (UMR 5244), University of Perpignan, Perpignan, France
5. Santé publique France, French national public health agency, Saint-Maurice, France
6. Regional Health Agency of Corsica, Ajaccio, France
7. Environnement Agency of Corsica (Office de l'environnement de Corse), Corsica, France
8. Urology department, Ormeau polyclinic, Tarbes, France
9. Internal Medicine, Bigorre Hospital, Tarbes, France
10. Infectious disease department, Nord Franche-Comté Hospital, Trévenans, France
11. Department of Parasitology-Mycology, CHU Toulouse, Toulouse, France
12. Both authors contributed equally to the study
13. Physiopathology Centre of Toulouse-Purpan, Toulouse University, CNRS, INSERM, UPS, Toulouse, France

**Correspondence:** Lauriane Ramalli (lauriane.ramalli@santepubliquefrance.fr)

## Citation style for this article:

Ramalli Lauriane, Mulero Stephen, Noël Harold, Chiappini Jean-Dominique, Vincent Josselin, Barré-Cardi Hélène, Malfait Philippe, Normand Guillaume, Busato Florian, Gendrin Vincent, Allienne Jean-François, Fillaux Judith, Boissier Jérôme, Berry Antoine. Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in southern Corsica since 2013. *Euro Surveill.* 2018;23(4):pii=18-00017. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017>

Article submitted on 10 Jan 2018 / accepted on 24 Jan 2018 / published on 25 Jan 2018

**Seven cases of urogenital schistosomiasis occurred in Corsica in 2015 and 2016. The episodes were related to exposure to the same river and involved the same parasite strain as an outbreak with 106 cases in summer 2013. The connection calls for further investigations on the presence of an animal reservoir and the survival of infested snails during winter. However, recontamination of the river from previously infected bathers remains the most likely hypothesis.**

Since 2015, seven cases of urogenital schistosomiasis reported exposure to the Cavu river in southern Corsica. They had no history of contact with fresh water in endemic areas. Here, we describe the cases indicating persistent schistosomal transmission linked to this river since 2013. To date, no contamination has been related to an exposure in 2017, but cases might arise in the coming months considering the long parasitic cycle in humans. Therefore, physicians in France and elsewhere should test possible clinical cases, regardless of the year of exposure to the Cavu river.

## Case description

In 2015 and 2016, five cases of urogenital schistosomiasis linked to exposure to the Cavu river in 2015 were notified to regional health authorities. An autochthonous urogenital schistosomiasis case was defined as a person with serological evidence of schistosomiasis or *Schistosoma* eggs in urine,

and no history of contact with fresh water in known endemic areas. A case was classified as confirmed when presenting *Schistosoma* eggs at urine or biopsy examination. We classified a case as probable when the person either presented one positive serological test and a positive Western blot, or two positive serological tests and no Western blot. A possible case was a person presenting one isolated positive serological test or two discordant serological tests.

The first probable case was detected at the end of 2015 (Table, Case 1) and described in a previous article [1]. In March 2016, based on the results from different serological tests for schistosomiasis, two members of another family were classified as probable cases (Table, Family 1). Cases 1, 2 and 3 reported swimming in the Cavu River in August 2015 in two different locations (Table). One location corresponded to a main focus of *Schistosoma* infections previously identified in an outbreak in 2013 [2], while the other was a location not known as a transmission area.

In February 2017, two members of another family were classified as confirmed cases upon identification of *Schistosoma* eggs in urine or bladder biopsy. They reported bathing in the Cavu, in both 2015 and 2016 (Table, Family 2). However, calcified eggs observed in the bladder wall of Case 4 suggest an old infection, probably attributable to exposure in 2015.



TABLE

Demographics, clinical manifestation, laboratory results and place of exposure for cases of autochthonous urogenital schistosomiasis contracted in the Cavu River, Corsica, France, 2015 or 2016 (n = 7)

|                                           | Case 1                  | Family 1  |              | Family 2              |                                   | Family 3                         |               |
|-------------------------------------------|-------------------------|-----------|--------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------|
|                                           |                         | Case 2    | Case 3       | Case 4                | Case 5                            | Case 6                           | Case 7        |
| Demographics                              |                         |           |              |                       |                                   |                                  |               |
| Adult (≥18 years)                         | Yes                     | No        | Yes          | No                    | Yes                               | Yes                              | Yes           |
| Resident of Corsica                       | No                      | No        | No           | No                    | No                                | No                               | No            |
| Clinical manifestation                    |                         |           |              |                       |                                   |                                  |               |
| Symptoms present                          | Yes                     | No        | No           | No                    | Yes                               | Yes                              | No            |
| Symptoms                                  | Abdominal pain, fatigue | NA        | NA           | NA                    | Dysuria, pollakiuria, renal colic | Dysuria, pollakiuria, haematuria | NA            |
| Onset                                     | Aug 2015                | NA        | NA           | NA                    | End of 2016                       | End of 2016                      | NA            |
| Laboratory results                        |                         |           |              |                       |                                   |                                  |               |
| Date of diagnosis                         | Oct 2015                | Mar 2016  | Mar 2016     | Feb 2017              | Feb 2017                          | Sep 2017                         | Sep 2017      |
| ELISA <sup>a</sup>                        | 4.67                    | 2.54      | 1.81         | 0.91                  | 0.22                              | 2.10                             | 0.9           |
| IHA <sup>b</sup>                          | 320                     | 320       | 160          | 80                    | 0                                 | 160                              | 160           |
| Western blot (kDa bands) <sup>c</sup>     | 30–34                   | 22–24     | 22–24, 30–34 | 22–24, 30–34          | 22–24, 30–34                      | 22–24, 30–34                     | 22–24, 30–34  |
| Eggs in urine or bladder biopsy           | Negative                | Negative  | Negative     | Positive <sup>d</sup> | Positive <sup>e</sup>             | Positive <sup>d,e</sup>          | Negative      |
| Case classification                       | Probable                | Probable  | Probable     | Confirmed             | Confirmed                         | Confirmed                        | Possible      |
| Exposure to the Cavu river                |                         |           |              |                       |                                   |                                  |               |
| Year                                      | 2015                    | 2015      | 2015         | 2015 and 2016         | 2015 and 2016                     | 2016 and 2017                    | 2016 and 2017 |
| Period                                    | 30 Jul–11 Aug           | 15–30 Aug | 15–30 Aug    | 30 Jul–14 Aug         | 30 Jul–14 Aug                     | 15–30 Jul                        | 15–30 Jul     |
| Reported swimming sites in the Cavu river |                         |           |              |                       |                                   |                                  |               |
| 3 piscines <sup>f</sup>                   | No                      | No        | No           | Yes                   | Yes                               | Yes                              | Yes           |
| Outdoor activity park <sup>g</sup>        | Yes                     | No        | No           | Yes                   | Yes                               | Yes                              | Yes           |
| Bridge Mulinu di Conca <sup>h</sup>       | No                      | Yes       | Yes          | No                    | No                                | No                               | No            |

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IHA: indirect haemagglutination assay; NA: not applicable.

<sup>a</sup> Bordier Affinity Products, Crissier, Switzerland. Positive if ≥1 (DO sample/DO control).

<sup>b</sup> Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France. Positive if titre ≥1/160.

<sup>c</sup> SCHISTO II Western blot IgG, LDBIO Diagnostics, Lyon, France. Positive with observation of bands at 22–24 kDa or 30–34 kDa [6].

<sup>d</sup> *Schistosoma* eggs identified in urine in microscopic examination.

<sup>e</sup> *Schistosoma* eggs identified in bladder biopsy.

<sup>f</sup> Latitude 41°43'56–66"N, longitude 9°17'38–11"E.

<sup>g</sup> Latitude 41°43'22–10"N, longitude 9°18'0–39"E.

<sup>h</sup> Latitude 41°42'17–03"N, longitude 9°20'05–02"E [5].

In September 2017, a new confirmed case was diagnosed upon identification of *Schistosoma* eggs in urine and biopsy of a bladder wall thickening, with a 9-month gross haematuria (Table, Family 3, Case 6). The patient reported exposure to the Cavu in summer 2016 and 2017; however, with only four weeks between the 2017 exposure and the diagnosis, the infection presumably occurred in 2016. Screening of the case's family members (n=7), who shared the same exposure, identified one additional possible case (Table, Case 7).

*Schistosoma* eggs from Case 4 and Case 6 were genotyped as previously described [2]. The eggs presented the same genotype, carrying the nuclear internal transcribed spacer (ITS) region from *S. haematobium* and the mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (cox1) gene from *S. bovis*. All mitochondrial

genes presented the Sb2 haplotype: this was the most common haplotype in the 2013 outbreak and is identical to the type found in people infected in West Africa [2].

### Environmental surveillance

Since 2014, *Bulinus truncatus* snails, the intermediate host of *S. haematobium*, have been collected weekly from the Cavu River from June to September, when water temperatures are optimal for schistosomal transmission. In 2014 and 2015, respectively 3,544 and 1,965 snails tested negative using microscopic techniques to observe the shedding of *Schistosoma* cercariae. Using a more sensitive technique relying on PCR amplification of the *Schistosoma* Dra1 repeat sequence, the 3,453 and 5,364 specimens collected in 2016 and 2017, respectively, also tested negative [3].



## Discussion

In 2013, urogenital schistosomiasis re-emerged in Europe, with 106 cases linked to exposure to the Cavu river in southern Corsica [4-7]. The parasite strain was a human-bovine hybrid *Schistosoma* (*S. haematobium* – *S. bovis*) of Senegalese origin [2]. Following this event, we developed surveillance for human cases and infected aquatic snail hosts to detect and control schistosomal transmission. Autochthonous urogenital schistosomiasis became notifiable in France in 2016.

The identification of three episodes of transmission over a 4-year period (2013, 2015 and 2016) and the close genetic relationship among the isolated parasites confirmed that schistosomes were maintained in a transmission cycle in or near the Cavu River in Corsica. Although cases with disputed serological evidence of infection (because of weak positivity) were reported among European travellers exposed to the Cavu River in 2014, no cases identified among French tourists or Corsican residents could be linked to the same year of exposure [8,9,10].

The presence of one or a combination of the following factors would lead to an ongoing transmission of schistosomiasis in Corsica linked to the Cavu River: the survival of infested snails over the winter, the presence of an animal reservoir along the river, or repeated bathing in this river by a human reservoir.

Whether or not infested snails survive in the Cavu River over the winter period is still uncertain. However, because the period between the first identified transmission in 2013 and the last in 2016 is longer than the expected lifetime of a snail, the survival of infested snails alone would not explain schistosomal transmission over a 4-year period.

The presence of a reservoir in livestock is unlikely, considering negative results from a previous *Schistosoma* seroprevalence study in cows and goats in southern Corsica ( $n = 3,479$ ). However, in light of the persistent transmission, the presence of a murine reservoir cannot be excluded. A screening study in rodents in 2015 yielded negative test results for *Schistosoma* infestation but was too small ( $n = 21$ ) to be conclusive [2].

The persistence of a human reservoir contaminated in the Cavu river appears possible, despite the screening and treatment efforts carried out in 2014 by health authorities and physicians [4]. Detection of infected individuals is challenging, as 66% of persons infected in the 2013 outbreak remained asymptomatic, and the median time to first symptom onset was 30 weeks [4]. In addition, this series of notified cases shows that the positivity threshold set for the first-line screening tests (ELISA and indirect haemagglutination assay) can miss confirmed cases. Both screening tests for Cases 4 and 5 were negative more than 6 months after their last exposure, while *Schistosoma* eggs were detected

through the microscopic examination of bladder biopsy or urine. Conversely, screening results well above the test threshold, associated with a positive confirmatory test (as in Cases 1 to 3), are strongly supportive of the diagnosis of schistosomiasis.

Environmental surveillance aims to detect at an early stage the presence of the parasite in the Cavu river in the summer season in order to implement rapid measures for limiting schistosomal transmission. Although several humans were infected in 2015, microscopic observation of molluscs did not detect the parasite. The PCR-based method used since 2016 might be more sensitive for detecting *Schistosoma* genetic material in both emitting and non-emitting molluscs. However, it did not detect any infested snails in 2016, when several persons were infected. This suggests a low level of infestation among river snails, and therefore low transmission of schistosomiasis. Environmental surveillance relies on weekly sampling of *B. truncatus* snails, which could miss the occasional infested specimen; however, only one infected snail is enough to contaminate several humans, or continue the cycle of transmission.

Given the probably limited transmission between 2015 and 2016 and the importance of the Cavu river as a tourism site, screening all individuals who report exposure to the river, regardless of year of exposure and presence of symptoms, is unlikely to be cost-effective in identifying a persistent human reservoir.

## Conclusion

Even if the most likely hypothesis for the maintenance of the parasite in the Cavu river is re-seeding by human hosts, other environmental factors cannot be yet ruled out. Research into the survival of infested snails during winter and a possible rodent reservoir along the river are necessary to evaluate the risk of ongoing transmission of urogenital schistosomiasis in the Cavu river. Techniques to detect the presence of the parasite directly in the water of the river are needed [11]. In the meantime, improving awareness among tourists and local residents exposed to the river and screening recommendations for physicians are fundamental as further cases could occur or become symptomatic. In order to increase the detection of cases and avoid any infected individuals remaining undiagnosed, diagnostic methods should be improved and the diagnostic strategy revised accordingly.

To better target information and communication strategies, Santé publique France and the regional health authority will conduct a study among general practitioners in Corsica on knowledge, attitudes and practices regarding schistosomiasis. In parallel, awareness campaigns directed at national and international tourists and local residents about the risk of contracting schistosomiasis should be pursued and reinforced. The maintenance of schistosomes on Corsica should alert other regions in Europe with environmental conditions



favourable to urogenital schistosomiasis transmission. Persons exposed to the Cavu river presenting symptoms compatible with urogenital schistosomiasis should be tested, regardless of the year of exposure.

## Acknowledgements

Funding for this surveillance is provided by Santé Publique France, the French Ministry of Health and the French agency for food, environmental and occupational health and safety (ANSES). We thank all the persons involved in the environmental surveillance at the regional health authority of Corsica (ARS Corse): G. Leccia, J. Mozziconacci, L. Vittori, A. Giovannoni, F. Maréchal, X. Ciccada, J-P Buresi. We thank the biomedical laboratories involved in the surveillance: Cerba (Saint-Ouen l'Aumône) and Biomnis (Lyon, Paris). We thank the municipality of Sainte-Lucie de Porto-Vecchio. We are thankful to Lisa Hansen for her constructive comments and reviews on the manuscript. We also thank the patients for their willingness to participate to the investigations.

## Conflict of interest

None declared.

## Authors' contributions

Medical investigation and screening of patients: A Berry, G Normand, F Busato, J Fillaux, V Gendrin. Contribution to the epidemiological investigations: H Noël, L Ramalli, P Malfait. Interview of the patients: H Noël, A Berry, L Ramalli. Environmental surveillance: S Mulero, J Boissier, J-F Allienne, J-D Chiappini, J Vincent, H Barré-Cardi. Genotyping: S Mulero, J-F Allienne, J Boissier. Drafted the manuscript: L Ramalli, S Mulero, H Noël, P Malfait. Contribution to the writing of the paper: J Boissier, A Berry.

## References

1. 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. *Euro Surveill.* 2016;21(1):30100. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.1.30100> PMID: 26767427
2. 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(8):971-9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00175-4) PMID: 27197551
3. Akinwale OP, Kane RA, Rollinson D, Stothard JR, Ajayi MB, Akande DO, et al. Molecular approaches to the identification of *Bulinus* species in south-west Nigeria and observations on natural snail infections with schistosomes. *J Helminthol.* 2011;85(3):283-93. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000568> PMID: 20854706
4. Noël H, Ruella M, Maccary A, Pelat C, Sommen C, Boissier J, et al. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect.* 2017;S1198-743X(17)30350-6.
5. Holtfreter MC, Moné H, Müller-Stöver I, Mouahid G, Richter J. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Euro Surveill.* 2014;19(22):20821. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.22.20821> PMID: 24925456
6. Berry A, Moné H, Iriart X, Mouahid G, Aboo O, Boissier J, et al. Schistosomiasis haematobium, Corsica, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(9):1595-7. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140928> PMID: 25153697
7. Boissier J, Moné H, Mita G, Bargues MD, Molyneux D, Mas-Coma S. Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(7):757-8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00084-5) PMID: 26122434

8. Berry A, Paris L, Boissier J, Caumes E. Schistosomiasis screening of travelers to Corsica, France. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(1):159. <https://doi.org/10.3201/eid2201.151290> PMID: 27055289
9. Gautret P, Mockenhaupt FP, von Sonnenburg F, Rothe C, Libman M, Van De Winkel K, et al. GeoSentinel Surveillance Network. Local and international implications of schistosomiasis acquired in Corsica, France. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(10):1865-8. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150881> PMID: 26401954
10. Beltrame A, Zammarchi L, Zuglian G, Gobbi F, Angheben A, Marchese V, et al. Schistosomiasis screening of travellers from Italy with possible exposure in Corsica, France. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(10):1887-9. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150869> PMID: 26401824
11. Kincaid-Smith J, Rey O, Toulza E, Berry A, Boissier J. Emerging schistosomiasis in Europe: a need to quantify the risks. *Trends Parasitol.* 2017;33(8):600-9. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.009> PMID: 28539255

## License and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence, and indicate if changes were made.

This article is copyright of the authors, 2018.

## b. Développement d'outils de diagnostic PCR rapide pour la détection intramolluscale simultanée de plusieurs espèces de trématodes

Pendant ma thèse j'ai eu l'occasion d'être impliqué dans d'autres projets visant à faire du diagnostic intramolluscal de trématodes, mais permettant cette fois-ci l'identification de plusieurs espèces de trématodes au sein d'un même mollusque. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Tine Huyse, Cyril Hammoud et Ruben Schols de l'Université de Tervuren et du Royal Museum for Central Africa de Tervuren en Belgique. Puis valorisés par deux études, l'une publiée (Schols et al., 2019) et l'autre en cours de valorisation (Hammoud et al., in prep). Ils s'inscrivent dans les efforts pour améliorer notre capacité à caractériser les communautés de trématodes, notamment les profils de co-infections en intramolluscal. Car les méthodes actuellement existantes pour ce faire reposent essentiellement sur de l'émission cercarienne et de la dissection de mollusques (Loker, Moyo, & Gardner, 1981; Eppert et al., 2002; Born-Torrijos et al., 2014). Ce sont des méthodes chronophages (Born-Torrijos et al., 2014) qui pour l'émission cercarienne ne permettent pas d'identifier les stades précoces de l'infection (Born-Torrijos et al., 2014). Elles nécessitent également l'échantillonnage de grandes quantités de mollusques compte tenu des faibles prévalences dans les populations naturelles (Eppert et al., 2002), ce qui limite notre vision de ces communautés. De fait, ces deux outils permettent d'améliorer notre capacité à identifier les foyers de transmission actif de maladies transmises par les mollusques d'eau douce par du diagnostic intramolluscal, notamment les bilharzioses.

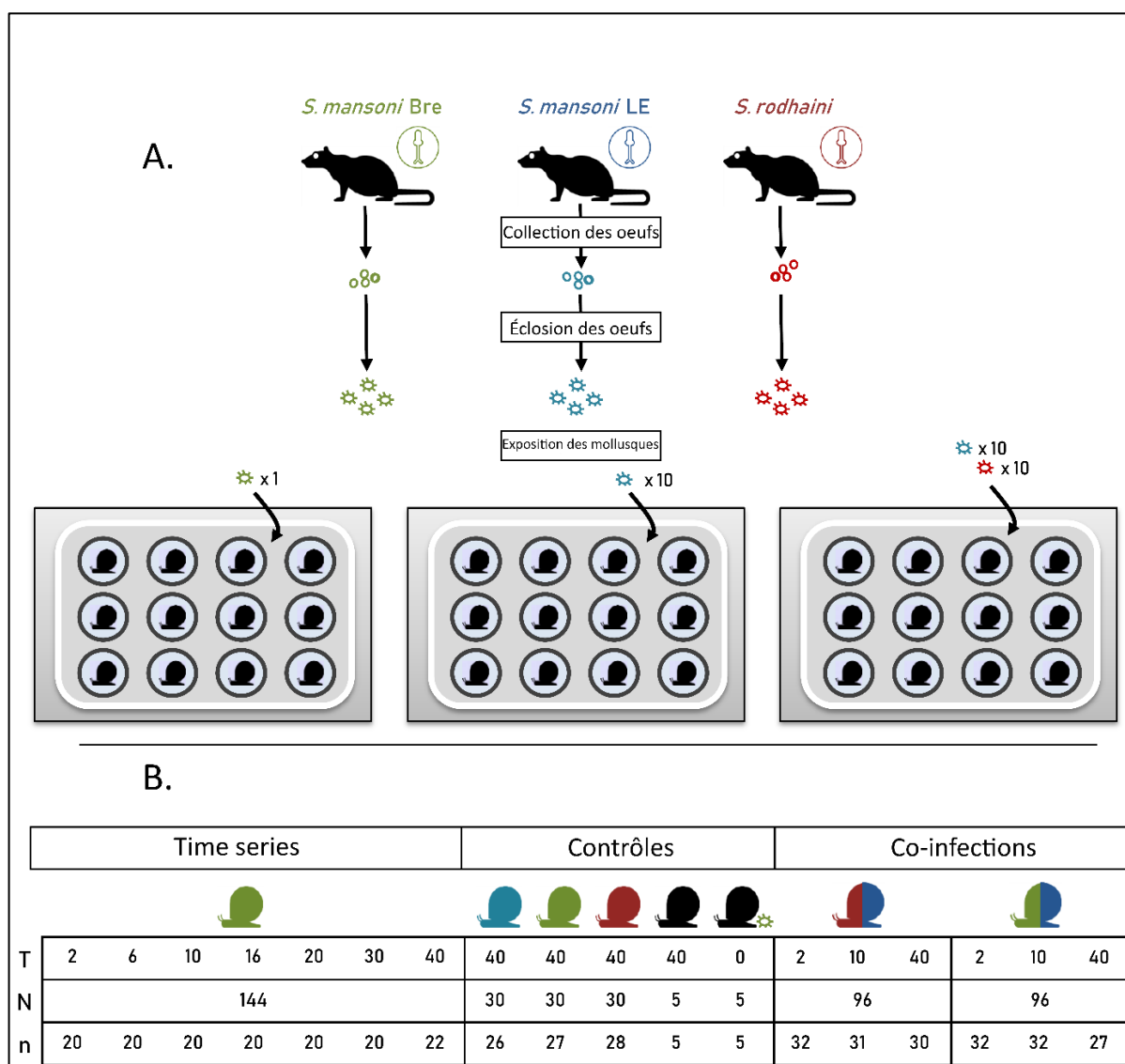
Nous avons travaillé sur plusieurs souches de *S. mansoni*, un parasite principalement présent dans l'Est de l'Afrique centrale, mais aussi en Amérique du Sud, et étant responsable de la bilharziose méésentérique humaine, connue pour son impact en santé humaine notamment en Afrique centrale (WHO, 2017a). Les hôtes intermédiaires de ce parasite sont des mollusques du genre *Biomphalaria* (Boissier et al., 2019). Et *S. rodhaini*, un schistosome de rongeurs principalement présent au Kenya et en Afrique du Sud (Schwetz, 1951), il utilise également des mollusques du genre *Biomphalaria* en guise d'hôtes intermédiaires (Schwetz, 1951), ce parasite est connu pour pouvoir s'hybrider avec *S. mansoni* (Theron, 1989), en effet, ces deux espèces partagent une bonne part de leur aire de distribution géographique en Afrique (Portet et al., 2019). L'hôte mollusque testé était une souche brésilienne de *B. glabrata*, un mollusque pulmoné d'eau douce (Malek, 1980), constituant l'hôte intermédiaire

de *S. mansoni* en Amérique du Sud (Malek, 1980; Boissier et al., 2019). Les mollusques du genre *Biomphalaria* sont capable de survivre de longues périodes lorsqu'ils sont retirés de leur environnement d'eau douce (Malek, 1980), cette résistance à des conditions environnementales très stressantes leur confèrent indirectement une bonne capacité à coloniser de nouveaux environnements (Pointier, David, & Jarne, 2005), des évènements qui nous l'avons vu en introduction, peuvent mener à des évènements d'émergence de bilharziose (Charbonnel et al., 2002).

Pour tester ces *outils in vitro*, nous avons réalisé à l'IHPE des expériences de co-infections de la souche brésilienne de *B. glabrata* qui ont été exposés à des combinaisons de deux souches de *S. mansoni* (*i.e.* Brésil et LE) et d'une souche de *S. rodhaini*. Nous avons donc réalisé 6 combinaisons d'infections, **Figure 16**, à savoir, 4 combinaisons d'infections « contrôle » mono-espèces, soit 3 séries de 30 *B. glabrata* chacun exposé à 10 miracidia ceci pour les trois souches de parasites (*i.e.* *S. mansoni* Brésil, LE et *S. rodhaini*), ces mollusques ont été fixés 40 jours après le début de l'expérience. Dans cette condition et avec ces souches de mollusques et parasites, l'exposition à 10 miracidia permet d'atteindre un succès d'infection élevée aux alentours de 70-80% contre 40% pour les infections monomiracidiales. Nous avons également réalisé une combinaison monomiracidiale appelée « time series » de 144 *B. glabrata* individuellement exposés à un miracidium de *S. mansoni* Brésil, dont les mollusques ont été fixés en respectant une cinétique de co-infection (*i.e.* 2, 6, 10, 16, 20, 30 et 40 jours post exposition, des pas de temps calibrés en fonction de nos connaissances sur la chronologie du développement parasitaire intramolluscal, **Figure 16**). L'objectif de cette série a été de vérifier si le nombre de séquences obtenues par séquençage via l'approche de séquençage ciblée d'amplicons de Cyril était corrélé avec le succès de l'infection parasitaire et l'avancement du développement parasitaire intramolluscal. Parallèlement, nous avons réalisé deux combinaisons de co-infections, l'une de 96 *B. glabrata* chacun exposé à un mélange de 10 miracidia de *S. rodhaini* et 10 miracidia de *S. mansoni* LE, ainsi qu'une seconde série de co-infections identique à la précédente, mais utilisant cette fois un mélange de 10 miracidia de *S. mansoni* Brésil et 10 miracidia de *S. mansoni* LE. Les mollusques des deux séries de co-infections ont été fixés 2, 10 et 40 jours post-exposition. Ces séries « co-infections » avaient pour but de tester la résolution taxonomique de l'outil de détection à deux échelles, intra-espèce (*i.e.* souches de parasites d'une même espèce) et inter-espèce (*i.e.* espèces



différentes). Tous ces mollusques ont ensuite été maintenus pour une durée maximale de 40 jours dans nos infrastructures en conditions stables (*i.e.* photopériode équilibrée 12 : 12 et température constante de 24°C).



**Figure 16. Expériences de cinétiques de co-infections menées pour tester la spécificité des outils de RD-PCR et de séquençage TAS.** A) Procédure de préparation des souches de parasites jusqu'à l'exposition contrôlée des mollusques hôtes aux miracidia de parasites par mise en contact pendant 24h. B) Combinaisons d'infections testées et nombre d'escargots infectés par combinaison (N) ainsi que le nombre de mollusques infectés échantillonnés (n) à chaque pas de temps de cinétique (T), exprimés en jours. (Source : Hammoud et al., in prep)

Certains de ces échantillons ont été utilisés pour tester la capacité de l'outil de Rapid Diagnostic PCR (RD-PCR) intramolluscal de Ruben Schols à détecter des infections de schistosomes africains dans les hôtes mollusque (Schols et al., 2019). Ce diagnostic de

présence/absence est basé sur l'amplification par PCR d'un marqueur l'ADN ribosomique 18S spécifique aux trématodes, ainsi qu'un marqueur internal transcriber spacer (ITS2) spécifique au genre *Schistosoma*. Il permet de faire la distinction entre des infections de schistosomes de l'Homme et de l'animal par rapport aux infections provoquées par d'autres espèces de trématodes, ceci afin d'intégrer la santé des mollusques dans la vision intégrative « One-Health » du cycle des bilharzioses. En cas de détection d'un signal de schistosome sur gel d'agarose, une seconde PCR multiplexe est réalisée pour identifier l'espèce de schistosome correspondante entre *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. mattheei*, *S. bovis/curassoni/guineensis* et *S. rodhaini* en se basant sur des différentiels de tailles de séquences pour un autre marqueur moléculaire sur la *cox1* (Schols et al., 2019). Ces outils de diagnostics RD-PCR ont également pour objectif de proposer un suivi environnemental abordable de la transmission de trématodes d'intérêt médical dans des régions d'endémicité de bilharziose où l'appareillage pour la biologie moléculaire peut être limité (Schols et al., 2019).

La seconde étude de Cyril Hammoud présente le développement d'un outil de séquençages d'amplicons ciblés (*i.e.* Targeted Amplicon Sequencing, TAS) basé sur un ensemble de marqueurs mitochondriaux (*i.e.* *cox1*, ITS, NAD1 et *cytb*) permettant le génotypage simultané au niveau de l'espèce (et de la souche de parasite pour *S. mansoni*) de mollusques du genre *Biomphalaria*, *Bulinus* et *Lymnaea* ainsi que des trématodes qui les infectent. Pour le moment cet outil a été testé *in vitro* sur *B. glabrata* et sur des trématodes qui peuvent le co-infecter (*i.e.* deux souches de *S. mansoni* Brésil et LE, ainsi que *S. rodhaini*). Cet outil s'est révélé être semi-quantitatif, car le nombre de séquences générées après séquençage augmentait en fonction de l'avancement du développement parasitaire intramolluscal, cependant cet outil ne permet pas la détection des infections à des stades précoces de développement (*i.e.* < 2 jours) ainsi que les infections avortées. Après une validation étendue de cette approche sur des mollusques prélevés en milieux naturels, cet outil moléculaire devrait permettre une identification intramolluscale partielle des communautés de trématodes, en particulier pour les espèces d'intérêt en santé humaine. Ce qui permettrait notamment d'identifier des profils de co-infections de trématodes dans les mollusques tout en donnant une idée sur l'intensité des infections parasitaires en cours. Cet outil est en cours de valorisation par l'écriture d'une publication (Hammoud et al., in prep), il diffère des approches de RD-PCR par sa sensibilité et sa précision dans l'identification

intramolluscale de profils de co-infection. Il diffère également des outils de metabarcoding environnemental présenté dans le chapitre suivant dans le sens où il s'agit ici d'un ensemble d'outils moléculaires ciblés dont les produits PCR sont ensuite séquencés, de fait, les amorces générées pour le diagnostic TAS sont généralistes, mais à des échelles taxonomiques plus restreintes que celles que nous utilisons en metabarcoding environnemental. De plus, cette approche ne permet pas de s'affranchir de la nécessité d'échantillonner de grandes quantités de mollusques ce qui peut limiter la vision de la communauté globale de trématodes. Cependant, le TAS est semi-quantitatif en plus d'être capable d'identifier les profils de co-infections, cette approche est donc particulièrement adaptée pour identifier et quantifier en intramolluscal l'effet des interactions biotiques entre les espèces de trématodes, des données précieuses à intégrer dans des stratégies de lutte biologique que nous allons aborder en chapitre III.

Avec le développement des outils de diagnostic ciblés présentés dans ce chapitre, nous avons amélioré notre capacité à collecter rapidement et de manière non invasive des données sur la distribution spatiale du parasite *S. haematobium* et de son hôte mollusque *B. truncatus* (Ramalli et al., 2018; Mulero, Boissier, et al., 2020). En plus de ces données d'occurrences, les protocoles associés à ces outils permettent également de récupérer un ensemble de données environnementales (*i.e.* température, pH, courant de l'eau et altitude) pour chaque site prospecté, permettant à terme une caractérisation partielle des habitats compatibles avec le développement de ces organismes (Mulero, Boissier, et al., 2020). L'association des données de distribution spatiale et des données environnementales ainsi obtenues avec nos connaissances sur les traits d'histoire de vie de *S. haematobium* peut donc se révéler utile pour identifier des sites compatibles avec une émergence future de bilharziose urogénitale (*i.e.* des sites hébergeant des mollusques compatibles avec le parasite et présentant pendant l'année des températures compatibles avec une émission de cercaires ; Kincaid-Smith et al., 2017; Mulero et al., 2019). Ces outils peuvent également être utiles pour caractériser la niche thermique des hôtes mollusques, notamment pour *B. truncatus*, qui à l'heure actuelle semble être l'élément le plus limitant dans la dispersion de *S. haematobium* dans le reste de l'Europe (Mulero et al., 2019).

## CHAPITRE III : Développement d'outils de metabarcoding environnemental pour la caractérisation et l'étude des communautés de mollusques et de trématodes en milieux naturels

---

Nous avons vu en chapitre I que les interactions abiotiques entre un organisme et son environnement ne sont pas les seuls éléments influant sur la capacité de ce dernier à s'établir dans un nouvel environnement (Kincaid-Smith et al., 2017; Delić & Fišer, 2019). En effet, les interactions biotiques (*i.e.* entre les organismes) sont également des facteurs déterminants qu'il convient de prendre en compte dans le processus d'établissement d'un parasite (Kincaid-Smith et al., 2017). Ces interactions interspécifiques sont des éléments moteurs qui façonnent la distribution géographique des espèces dans le monde (Delić & Fišer, 2019). En parasitologie, identifier ces interactions peut d'une part permettre de mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle des hôtes d'un parasite (Mulero, Toulza, et al., 2020) et d'autre part cela peut permettre la mise en place de stratégies de lutte biologiques (ou biocontrôle) à l'encontre d'un parasite en exploitant des interactions interspécifiques délétères pour les parasites, ou délétères pour leurs hôtes mollusques (Kwenti, 2017). Par ces approches de biocontrôle, il est possible d'exploiter plusieurs niveaux d'interactions pour ralentir, voire stopper localement la transmission d'un parasite de mollusques.

(i) Les interactions les plus couramment utilisées en biocontrôle sont les interactions entre les mollusques/trématodes et leurs prédateurs/compétiteurs naturels non-mollusques/non-trématodes (Arostegui et al., 2019). Par exemple, l'interaction entre le *Thiaridae* d'eau douce *Melanoides tuberculata*, un hôte intermédiaire de la douve chinoise *Clonorchis sinensis*, et la carpe noire (*Mylopharyngodon piceus*) a été étudiée pour être utilisée afin de diminuer la transmission de la douve chinoise à l'Homme au Vietnam (Hung, Duc, Stauffer, & Madsen, 2013). Ces mollusques constituent des proies pour les carpes noires juvéniles, qui diminuent significativement les populations de mollusques dans les environnements où elles ont été introduites (Hung et al., 2013). En ce qui concerne les trématodes, des études menées sur *Diplostomum pseudospathaceum*, un trématode de poisson, ont démontré que les cercaires de ce parasite constituaient des proies pour plusieurs espèces de zooplanctons notamment les cyclopoïdes qui peuvent diminuer la transmission de parasites en milieux aquatiques



(Mironova, Gopko, Pasternak, Mikheev, & Taskinen, 2019). Dans ce contexte, le rôle de plusieurs espèces prédatrices de cercaires dans la limitation de la transmission de parasites d'eau douce a fait l'objet de revues de littérature (Johnson et al., 2010; Orlofske, Jadin, & Johnson, 2015) pour être réutilisé dans des programmes de contrôles de maladies aquatiques (Mironova et al., 2019). En dehors de la prédation, les espèces qui exploitent les mêmes ressources alimentaires que les mollusques peuvent également s'avérer d'intérêt en lutte biologique, cela a été démontré lors de programmes d'introduction de la carpe des roseaux (*Ctenopharyngodon idella*) en Égypte, où cette espèce a permis de réduire la taille des populations de *Biomphalaria alexandrina*, un hôte intermédiaire de *S. mansoni*, et de *B. truncatus*, hôte de *S. haematobium* (Van Schayck, 1985; Slootweg, 1995). Dans cet exemple, la réduction des populations de mollusques résulte de la mise en compétition trophique entre les mollusques et les poissons introduits pour les végétaux qui sont à la base de leur alimentation (Van Schayck, 1985; Slootweg, 1995).

(ii) Les interactions mollusques-mollusques constituent également des données précieuses à intégrer dans les stratégies de biocontrôle, car certaines espèces peuvent limiter le développement de mollusques d'intérêt médical ou vétérinaire (Amarista, Niquil, Balzan, & Pointier, 2001). Dans la première partie de ce chapitre, je présenterais quelques exemples de ces interactions, notamment les phénomènes de compétition inter-espèce de mollusques pour un même habitat (Pointier & David, 2004), ainsi que le cas des espèces de mollusques invasives qui peuvent exclure par compétition une espèce de mollusque autochtone (Goldberg et al., 2013; Vinarski, 2017).

(iii) Les interactions mollusques-parasites, que j'illustrerais en première partie de chapitre avec l'exemple des mollusques leurres, qui attirent les miracidia de trématodes aussi efficacement qu'un mollusque compatible, mais dans lesquels les parasites ne pourront pas poursuivre leur développement (Combes & Moné, 1987).

(iv) Les interactions parasites-parasites, que je présenterais dans la seconde partie de ce chapitre avec l'exemple de la compétition intramolluscale entre deux espèces de trématodes (Laidemitt et al., 2019), résultant soit en la mort prématurée de l'hôte mollusque et donc des deux parasites, soit en une diminution de la transmission de trématodes de l'Homme (Sandland, Rodgers, & Minchella, 2007).

Pour avoir une visibilité sur ces d'interactions, il faut nécessairement avoir une vision intégrative des cycles parasites, une vision qui tienne compte des variables environnementales, mais aussi de la présence d'autres organismes dans l'environnement et de leur impact sur le parasite ou ses hôtes (Susser & Susser, 1996; Cordier et al., 2020). C'est de ce constat que notre vision des cycles parasites n'est que partielle, que le paradigme de l'éco-épidémiologie a été proposé en fin de XX<sup>e</sup> siècle afin d'étudier de manière plus intégrative les cycles parasites (Susser & Susser, 1996; Escobar & Craft, 2016). De ce paradigme, une nouvelle stratégie de recherche se proposant d'étudier la dynamique de maladies infectieuses par l'étude de la dynamique spatiale et temporelle de tous les organismes impliqués dans le cycle parasite est né (Escobar & Craft, 2016). De fait, l'éco-épidémiologie est une stratégie de recherche connexe au concept One-Health que nous avons abordé en introduction (Destoumieux-Garzon et al., 2018).

En éco-épidémiologie et en particulier en ce qui concerne les interactions biotiques, la première étape pour quantifier ces interactions est de disposer de connaissances sur l'assemblage des communautés d'organismes localement présentes et de réactualiser ces données régulièrement (Cordier et al., 2020), ce qui implique un suivi régulier de la biodiversité de chaque environnement prospecté avec les contraintes inhérentes aux techniques de prospection visuelle et à la main d'œuvre qu'elles requièrent (Cordier et al., 2020). En ce qui concerne les milieux d'eau douce, nous pouvons ajouter à ces difficultés la complexité pour faire un suivi des espèces d'eau douce que nous avons précédemment évoqué (Collen et al., 2014). Dans ce contexte également, le suivi par ADNe constitue une alternative intéressante aux approches traditionnelles (Philip Francis Thomsen & Willerslev, 2015). Cela permet notamment le suivi rapide de communautés entières à partir d'échantillons environnementaux tout en diminuant le coût en temps et en main-d'œuvre associés aux techniques de suivi classiques (Deiner et al., 2017). En effet, ces approches dites généralistes, également appelées metabarcoding environnemental, se basent sur le même principe que les diagnostics moléculaires ciblés (ou barcoding) (*i.e.* l'association d'une séquence d'ADN à une espèce ; Coissac, Riaz, and Puillandre, 2012). Le principe de ces méthodes généralistes consiste à amplifier une portion de séquence d'ADN ou d'ARN en utilisant un marqueur spécifique à un ensemble d'espèces (Coissac et al., 2012). Les marqueurs moléculaires utilisés pour ce type d'approches sont donc spécifiques à des échelles

taxonomiques plus larges que l'espèce ou le genre, ils sont généralement spécifiques à toute une classe ou sous-classe (Taberlet et al., 2012; Philip Francis Thomsen & Willerslev, 2015). Après l'amplification, les produits obtenus sont séquencés en utilisant des plateformes de séquençage haut débit ou « Next-Generation Sequencing » (NGS), (Coissac et al., 2012). À cet égard, le metabarcoding environnemental et plus généralement le metabarcoding est une approche de plus en plus courante dans la littérature scientifique grâce à l'accessibilité grandissante aux technologies de séquençage NGS et à l'apparition de plateformes de séquençage pouvant sous-traiter cette étape du protocole (Taylor & Harris, 2012).

Cependant, le metabarcoding environnemental demeure moins répandu dans la littérature scientifique que les outils ADNe ciblés ou de barcoding environnemental (Ficetola et al., 2008; Philip Francis Thomsen & Willerslev, 2015; Hanfling et al., 2016; Krol et al., 2019; Prié et al., 2020), principalement en raison de la difficulté à obtenir des marqueurs moléculaires fiables permettant la détection d'une grande diversité d'espèces à partir d'échantillons environnementaux (Alberdi, Aizpurua, Gilbert, Bohmann, & Mahon, 2018). Partant du constat qu'il est impossible de créer des sondes s'hybridant parfaitement avec l'ADN de l'ensemble du vivant sans se heurter à des problèmes de résolution au niveau de l'espèce (Alberdi et al., 2018), la plupart des techniques existantes sont généralement spécifiques à des rangs taxonomiques moins larges tels que des classes et sous-classes (Philip Francis Thomsen & Willerslev, 2015). Historiquement, ce sont les microbiologistes qui ont commencé à utiliser le metabarcoding environnemental dans les années 2000, pour permettre la caractérisation de la diversité d'organismes fongiques ou bactériens incultivables y compris pour les espèces rares ou cryptiques dont la trace ADN est bien souvent la seule manière de les détecter (Sogin et al., 2006; Coissac et al., 2012). Par la suite, ces approches de metabarcoding environnemental ont été adaptées à la caractérisation de la biodiversité de macroorganismes tels que des plantes ou des animaux principalement représentés par leur ADN ou ARN dans les échantillons environnementaux (Coissac et al., 2012; Philip Francis Thomsen & Willerslev, 2015). Le metabarcoding environnemental est donc un outil d'intérêt permettant une caractérisation à large échelle de la biodiversité tout en diminuant l'effort d'échantillonnage nécessaire pour y parvenir (Taberlet et al., 2012), son application dans les milieux d'eau douce apparait donc essentielle compte tenu de la difficulté de faire un suivi des espèces qui vivent dans ces environnements (Collen et al., 2014). Dans ce contexte, des outils

de metabarcoding environnemental ont été développés pour la caractérisation de communautés d'organismes en milieux d'eau douce notamment pour le suivi de populations d'amphibiens (Ficetola et al., 2008), de poissons (Hanfling et al., 2016), d'arthropodes (Krol et al., 2019) et plus récemment de bivalves (Prié et al., 2020). À l'heure actuelle aucun outil similaire n'a été développé pour caractériser les communautés de mollusques entières (*i.e.* malacofaunes) et de trématodes. Pourtant ce type d'approche généraliste permettrait une identification simultanée des foyers de transmissions et des sites à risque de transmission, pour l'approche ciblant les trématodes, et des sites à risque d'émergence pour l'approche ciblant les mollusques, de plusieurs maladies d'eau douce d'intérêt médical ou vétérinaire. Notre objectif a donc été de développer ces deux outils généralistes manquants afin de mieux comprendre l'assemblage de ces communautés, leur dynamique et donc indirectement la dynamique des maladies transmises par les mollusques dans ces environnements.

## 1. Caractérisation des communautés de mollusques d'eau douce par metabarcoding environnemental

- **Publication 5 : Mulero, S. ; Toulza, E. ; Loisier, A. ; Zimmerman, M. ; Allienne, JF ; Foata, J. ; Quilichini, Y. ; Pointier, JP. ; Rey, O. ; Boissier, J. (2021). Malacological survey in a bottle of water: A comparative study between manual sampling and environmental DNA metabarcoding approaches. GECCO, e01428(25). Doi : 10.1016/j.gecco.2020.e01428**

Parmi les invertébrés d'eau douce, les mollusques sont l'un des groupes les moins représentés dans les études d'inventaire de la biodiversité si on ne considère que les approches basées sur l'ADNe (Belle, Stoeckle, & Geist, 2019). En metabarcoding environnemental, la majorité des études existantes pour les espèces d'eau douce se focalisent principalement sur les amphibiens (Ficetola et al., 2008; Dejean et al., 2011; Prié et al., 2020) et sur les poissons (Klymus et al., 2017; Cilleros et al., 2019; Prié et al., 2020). En effet, il n'existe à l'heure actuelle qu'un seul outil de metabarcoding environnemental publié très récemment, et qui permet de caractériser les communautés de bivalves par ADNe (Prié et al., 2020). Toutefois aucun outil similaire n'existe pour la caractérisation par ce même moyen de la malacofaune plus généralement.



Ceci s'explique par le fait que les invertébrés d'eau douce en particulier les mollusques sont généralement mis de côté lors des études d'impact environnemental et dans les politiques de conservation, pour les raisons évoquées en chapitre 2 (*i.e.* difficulté à échantillonner et à identifier, forte endémicité, Collen et al., 2014; Prié et al., 2020). Pourtant les mollusques d'eau douce sont importants pour nos écosystèmes. Nous avons déjà évoqué le rôle de ces organismes dans la transmission de parasitoses humaines et animales (Lu et al., 2018). Par ailleurs, les mollusques d'eau douce sont également de bons indicateurs de l'état de santé des écosystèmes d'eau douce car sujets à des extinctions massives en raison de la dégradation de ces milieux lorsque ces derniers sont perturbés par les activités humaines ou par des invasions biologiques (Bouchet, Falkner, & Seddon, 1999; Lydeard et al., 2004; Johnson et al., 2013). Les mollusques sont également impliqués dans plusieurs cycles biochimiques (Hill & Griffiths, 2017) et sont des organismes à la base de nombreux réseaux trophiques notamment pour les poissons (Dillon, 2000). Enfin, dans le contexte de recrudescence d'émergence et ré(émergence) de maladies infectieuses transmises par les mollusques d'eau douce dans le monde (Kincaid-Smith et al., 2017), le suivi des communautés de mollusques devient nécessaire pour évaluer le risque de transmission de ces maladies aux populations humaines ou animales avoisinantes (Mulero, Boissier, et al., 2020).

Pour en revenir aux interactions biotiques, être capable de caractériser les malacofaunes de manière exhaustive par ADNe permettrait de mieux identifier les environnements présentant une malacofaune favorable ou défavorable à l'établissement et au développement d'une espèce de mollusques d'intérêt médical ou vétérinaire, notamment par l'identification d'espèces compétitrices dans l'environnement (Amarista et al., 2001). En effet, les interactions interspécifiques sont connues pour impacter la structure des communautés de mollusques en limitant ou en favorisant le développement de certaines espèces (Cedeno-Leon & Thomas, 1982; Amarista et al., 2001; Goldberg et al., 2013; Vinarski, 2017). Par exemple l'étude de Amarista et al., 2001 a démontré dans un lac du Venezuela que le mollusque ubiquiste *B. glabrata*, hôte intermédiaire majeur de la bilharziose méésentérique, parvenait difficilement à se développer dans les environnements dominés par *Biomphalaria prona* un mollusque du même genre peu permissif au même parasite. Cela suggère de la compétition interspécifique entre ces deux espèces, une compétition se traduisant par une ségrégation d'habitat pour ces deux mollusques. Ainsi, alors que *B. prona* occupe

majoritairement les lacs, *B. glabrata* est principalement retrouvé dans des sites marécageux temporaires (Amarista et al., 2001). Par ailleurs, des études menées en Guadeloupe ont démontré que *Marisa cornuarietis*, un prosobranch d'eau douce préférant les habitats à faible courant, est un compétiteur de *B. glabrata* sur le plan trophique (Cedeno-Leon & Thomas, 1982; Pointier & David, 2004; Pointier, David, & Jarne, 2010). Dans cette interaction, *B. glabrata* est plus affecté par cette concurrence (*i.e.* exclu par compétition du milieu expérimental) que *M. cornuarietis* (Pointier & David, 2004). De plus, cette compétition interspécifique semble n'affecter que *B. glabrata* et aucune autre espèce endémique (Pointier & David, 2004). Ces résultats suggèrent que *M. cornuarietis* constitue un agent de lutte biologique d'intérêt à l'encontre de *B. glabrata* et indirectement à l'encontre de la bilharziose méésentérique dans ces environnements (Cedeno-Leon & Thomas, 1982; Pointier & David, 2004).

En dehors des phénomènes de compétition interspécifique, certaines espèces de mollusques peuvent limiter la transmission de parasites par effet de leurre ou « decoy effect » (Combes & Moné, 1987). Dans cette interaction, les miracidia du parasite *S. mansoni* tentent d'infecter le mollusque « leurre » *M. cornuarietis* non compatible alors même que le mollusque compatible *B. glabrata* est présent dans l'environnement. Les miracidia sont ainsi éliminés soit en s'épuisant en tentant de pénétrer les tissus du mollusque incompatible, soit en étant dégénérés dans les tissus de ce dernier (Combes & Moné, 1987). Combes et Moné ont également émis un troisième mécanisme hypothétique quant à la possibilité qu'un miracidium ayant précédemment tenté d'infecter un mollusque leurre puisse plus facilement stimuler le système immunitaire d'un mollusque compatible et donc puisse plus facilement être éliminé lors de futures interactions avec des mollusques compatibles (Combes & Moné, 1987).

D'un point de vue écologique, les espèces de mollusques hautement invasives telles que *P. antipodarum* et *P. acuta* sont également susceptibles d'exclure par compétition des espèces de mollusques autochtones quand elles envahissent de nouveaux environnements en atteignant localement de très fortes densités et donc en surconsommant les mêmes ressources alimentaires que les espèces autochtones (Ponder, 1988; Goldberg et al., 2013; Vinarski, 2017). Par exemple, le *Thiaridae* d'eau douce *Tarebia granifera* a récemment envahi la Martinique suite à une introduction datant de 1991 probablement liée aux activités

d'aquariophilie (Facon & David, 2006). Les populations de ce mollusque peuvent atteindre localement de fortes densités, et devenir des compétiteurs trophiques pouvant exclure d'autres espèces, notamment *B. glabrata* l'hôte intermédiaire local de *S. mansoni* (Facon & David, 2006). Cependant ces mollusques excluent également d'autres espèces des milieux d'eau douce qu'ils envahissent, et constituent de fait une menace pour la biodiversité locale (Facon & David, 2006). Le suivi de ces espèces de mollusques invasives s'avère important à prendre en compte dans les initiatives de gestion des écosystèmes d'eau douce compte tenu de l'impact écologique qu'elles peuvent avoir (Goldberg et al., 2013).

Afin de pouvoir caractériser les malacofaunes à large échelle. Nous nous sommes donc proposés de développer un outil de metabarcoding environnemental permettant la caractérisation et le suivi des communautés de mollusques d'eau douce. Cette étude a consisté dans un premier temps, à développer l'outil par l'intermédiaire d'analyses *in silico*, plus précisément de tester nos marqueurs par des successions de PCR virtuelles sur de larges jeux de données. Dans un second temps, ces marqueurs ont été testés *in vitro* sur des ADN extraits puis amplifiés individuellement ou en « pool » afin de simuler des communautés fictives contenant l'ADN de plusieurs espèces de mollusques. Après cette phase expérimentale, cet outil a été validé directement en milieu naturel à l'occasion d'un suivi malacologique mené par Anaïs Loisier et Meryl Zimmerman sur 31 sites faisant partie d'une liste de 50 sites annuellement suivis par l'ARS de Corse (ARS, 2019). Ces sites correspondent à des sites de baignades hautement fréquentés par les touristes en période estivale et qui peuvent donc constituer un risque infectieux pour l'Homme (ARS, 2019). Cette mission menée pendant l'été 2018 avait pour but de recenser tous les sites à bullins de Corse, et ainsi cibler les rivières potentiellement compatibles avec l'introduction et la transmission du parasite *S. haematobium*. Notre outil de metabarcoding environnemental a été validé sur 23 de ces sites répartis sur 13 rivières à travers la Corse, de même que pour l'outil développé pour la détection de *B. truncatus*, nous avons opté pour une approche comparative systématique de l'outil de metabarcoding environnemental avec une prospection malacologique classique pour chacun des sites. Ce choix nourrissait l'idée que nous aboutirions ainsi plus rapidement à un outil applicable à une problématique de santé publique, ici l'émergence de bilharziose en Corse.

Les résultats de cette étude ont démontré la performance de l'ADNe pour le suivi des malacofaunes d'eau douce. En considérant tous les sites prospectés, les deux approches ont détecté les 11 mêmes espèces de mollusques. L'outil de metabarcoding environnemental a été capable de confirmer 97% des détections obtenues par prospection visuelle. Alors que la prospection visuelle n'a confirmé que 77% des observations totales obtenues en ADNe, méthode pour laquelle nous avons détecté en moyenne un plus grand nombre d'espèces. Cette plus grande richesse spécifique obtenue par ADNe a déjà été reportée lors de précédentes utilisations du metabarcoding environnemental pour de nombreux organismes (Hanfling et al., 2016; Deiner et al., 2017; Prié et al., 2020). Dans les milieux lotiques tels que ceux prospectés dans cette étude, cela peut s'expliquer par le fait que les molécules d'ADN libre ou complexées présentes dans l'environnement peuvent être transportées de l'amont vers l'aval via le courant, rendant possible la détection d'organismes en amont du point d'échantillonnage (Deiner et al., 2016; Hanfling et al., 2016). Ces résultats peuvent expliquer en partie les conclusions de précédentes études ayant démontré qu'en une unique session de prospection visuelle, en moyenne 20% des espèces de mollusques présentes sur le site prospecté ne seront pas détectées en raison de leur aspect cryptique ou de leur choix d'habitats (Dubart et al., 2019), ce qui sous-entend de devoir multiplier les suivis visuels pour avoir une représentation exhaustive de la malacofaune locale, en particulier pour les espèces préférant des habitats difficilement accessibles à l'Homme (Mulero, Toulza, et al., 2020).

Lors de cette étude, nos résultats ont également permis de mettre à jour les données de distribution spatiale de 4 espèces de mollusques d'intérêt en écologie ou en santé publique et vétérinaire, notamment deux espèces hautement invasives à savoir *P. antipodarum* originaire de Nouvelle-Zélande et *P. acuta* originaire d'Amérique du Nord dont la présence peut potentiellement affecter la distribution d'autres espèces de mollusques (Goldberg et al., 2013; Vinarski, 2017), comme évoqué précédemment, ces mollusques peuvent atteindre localement d'importantes densités, et donc entrer en compétition avec les espèces autochtones en surconsommant les mêmes sources d'alimentations (Ponder, 1988; Vinarski, 2017). De fortes densités ont en effet été observées lors de cette étude, car ces deux espèces faisaient partie des 3 espèces les plus abondantes sur les 23 sites prospectés, avec *Ancylus fluviatilis*. Nous avons également atteint notre objectif de mission en mettant à jours la distribution de deux espèces de mollusques impliquées dans la transmission de parasitoses

humaines et animales, à savoir *B. truncatus* pour la bilharziose urogénitale et *G. truncatula* pour la fasciolose. Avec ces données il nous a été possible d'identifier un ensemble de sites positifs à *B. truncatus* détectés uniquement par ADNe et jamais reportés auparavant. Ces sites non loin de la commune d'Ajaccio, la plus grande ville de l'île, feront l'objet d'une confirmation de terrain pour la présence de *B. truncatus* cet été 2020 pour les rivières concernées.

Cet outil de metabarcoding environnemental constitue donc une alternative aux techniques de prospection visuelles, l'avantage de ce type d'approche réside principalement dans la capacité de faire un suivi global de la biodiversité tout en diminuant l'effort d'échantillonnage nécessaire pour y parvenir en comparaison avec des approches de prospection visuelle (Taberlet et al., 2012), ce qui s'avère particulièrement utile pour les espèces difficiles à suivre telles que celles retrouvées en milieux d'eau douce (Collen et al., 2014). Cependant ce type d'approche ne permet pas, à l'heure actuelle, de totalement remplacer la prospection classique car elle ne permet pas d'obtenir de données quantitatives précises (Deiner et al., 2017; Mulero, Toulza, et al., 2020; Yates et al., 2020), des données qui sont essentielles pour étudier les interactions interspécifiques au sein de ces communautés et leur impact sur la distribution des espèces de mollusques. Nous reviendrons sur cette limitation technique du metabarcoding environnemental en termes d'estimations d'abondance dans les perspectives, avec la présentation d'approches statistiques permettant d'augmenter la précision des données issues de ce type d'approches (Yates et al., 2020). Cependant cet outil s'avère parfaitement adapté pour caractériser les malacofaunes de milieux pour lesquels ces données sont rares ou inexistantes (Mulero, Toulza, et al., 2020). Enfin, bien que l'outil ait été validé uniquement en rivière (*i.e.* des milieux d'eau douce non stagnants, lotiques), ce protocole est actuellement en train d'être validé dans des milieux d'eau douce stagnants (*i.e.* lentic) en Guadeloupe sur une cinquantaine de sites. Ceci dans le cadre du projet « Next Generation Biomonitoring of change in ecosystem structure and function » (NGB) en collaboration avec Philippe Jarne, Patrice David et Kevin Bethunes du CEFE de Montpellier. Ces résultats permettront le cas échéant d'améliorer cet outil pour qu'il soit applicable sur la plus large diversité d'environnements possible, un élément qui fait bien souvent défaut aux outils de diagnostics ADNe existants y compris le nôtre, car ces derniers sont généralement validés sur une diversité d'environnements limités (Tsuji et al., 2019).



# **Malacological survey in a bottle of water: A comparative study between manual sampling and environmental DNA metabarcoding approaches**

## **Running Title**

Environmental DNA for malacological monitoring

## **Authors**

Stephen Mulero<sup>1,\*</sup>, Eve Toulza<sup>1</sup>, Anaïs Loisier<sup>1</sup>, Meryl Zimmerman<sup>1</sup>, Jean-François Allienne<sup>1</sup>, Joséphine Foata<sup>2</sup>, Yann Quilichini<sup>2</sup>, Jean-Pierre Pointier<sup>3</sup>, Olivier Rey<sup>1,‡</sup>, Jérôme Boissier<sup>1,‡</sup>

## **Contact Information**

<sup>1</sup> University of Perpignan, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France.

<sup>2</sup> UMR SPE 6134, CNRS – Università di Corsica Pascal Paoli, 20250 Corte, Corsica, France.

<sup>3</sup> PSL University, USR3278 CRILOBE EPHE-CNRS-UPVD, F-66860 Perpignan, France.

<sup>‡</sup> Both authors contributed equally to the study

\* Correspondence – [stephen.mulero@univ-perp.fr](mailto:stephen.mulero@univ-perp.fr)

## **E mail address**

SM: [stephen.mulero@univ-perp.fr](mailto:stephen.mulero@univ-perp.fr)

ET: [eve.toulza@univ-perp.fr](mailto:eve.toulza@univ-perp.fr)

AL: [anais.loisier@gmail.com](mailto:anais.loisier@gmail.com)

MZ: [zimmermann.meryl@gmail.com](mailto:zimmermann.meryl@gmail.com)

JFA: [allienne@univ-perp.fr](mailto:allienne@univ-perp.fr)

22 JF: foata\_j@univ-corse.fr

23 YQ: quilichini\_y@univ-corse.fr

24 JPP: pointier@univ-perp.fr

25 OR: olivier.rey@univ-perp.fr

26 JB: boissier@univ-perp.fr

## 27 **ABSTRACT**

28 To assess the effect of anthropogenic activities on ecosystems, it is of prime importance to  
 29 develop new tools enabling a rapid characterisation of ecological communities. Freshwater  
 30 ecosystems are particularly impacted and threatened by human activities and need thorough  
 31 attention to preserve their biodiversity and the ecological services they provide. Studying such  
 32 ecosystems is generally difficult because the associated organisms are hard to sample and to  
 33 monitor. We present a ready to use environmental metabarcoding diagnostic tool to  
 34 characterise and monitor the freshwater malacofauna from water samples. The efficiency of  
 35 this new tool was compared to a classical malacological survey at 19 sampled sites from 10  
 36 distinct rivers distributed over Corsica Island (France). Our eDNA monitoring tool  
 37 demonstrated a remarkable ability to reconstitute the local malacofauna compared to the  
 38 malacological survey, with 97.1% of species detection confirmed by both methods. The  
 39 present tool successfully detected the 11 freshwater snail species previously reported in  
 40 Corsica by malacological survey but was limited at the genus level for some species.  
 41 Moreover, our malacological survey allowed an update of the local distribution of a wide  
 42 diversity of freshwater snails including invasive species (i.e. *Potamopyrgus antipodarum* and  
 43 *Physa acuta*) as well as snail hosts of pathogens of medical and veterinary importance (i.e.  
 44 *Bulinus truncatus* and *Galba truncatula*).

45

46 **Keywords:** biomonitoring, Corsica, environmental DNA, invasive snail, malacology,  
47 metabarcoding, snail communities

48

## 49 **INTRODUCTION**

50 Anthropogenic activities have adverse effects on ecosystems (Parmesan and Yohe, 2003),  
51 including a decrease of biodiversity (Waldron et al., 2017), habitat fragmentation (Strayer and  
52 Dudgeon, 2010) and pollution (Blettler et al., 2018). Freshwater ecosystems appear to be  
53 particularly threatened by human activities leading to local species extinction (Blettler et al.,  
54 2018). According to the IUCN Red list, 46% of these ecosystems worldwide are endangered  
55 or vulnerable (Janssen et al., 2016). However, these ecosystems host 10% of all known  
56 species despite representing only 0.8% of the Earth's surface (Strayer and Dudgeon, 2010).  
57 Moreover, they also provide important ecological services for the development of human  
58 populations (Carpenter et al., 2011).

59 Over freshwater species, gastropods have received particular attention for several  
60 reasons. First, they are suffering massive extinction notably due to habitat loss/degradation,  
61 the introduction of alien species and, in some cases, overexploitation (Bouchet et al., 1999,  
62 Johnson et al., 2013, Lydeard et al., 2004). Second, they play a key role in the functioning of  
63 most freshwater habitats. They are involved in the cycle of several biochemicals especially  
64 nitrogen (Hill and Griffiths, 2017) and are at the basis of many food webs especially fishes  
65 (Dillon, 2000). Freshwater snails are also reliable bio indicators in particular for detecting the  
66 presence of environmental organic or inorganic pollutants such as heavy metals, or  
67 microorganisms that are accumulated in their tissues (Mahmoud and Abu Taleb, 2013,  
68 Tallarico, 2016). Finally, several freshwater gastropods are of medical or veterinary

importance as they constitute intermediate hosts for several pathogens (e.g. *Trematoda*) (Lu et al., 2018). Under the ongoing global changes, these diseases are currently (re-)emerging worldwide at an alarming rate (Kincaid-Smith et al., 2017). Hence, monitoring these snail species is crucial to address risk maps and thus prevent the transmission of these infectious diseases to nearby human and animal populations (Mulero et al., 2020).

Unfortunately, the monitoring of freshwater snails is challenging because: (i) there is no standardised monitoring protocol (Tallarico, 2016); (ii) their populations are spatially and temporally highly dynamic (Lamy et al., 2012); and (iii) classical methods used to collect and to identify snail species are time-consuming, laborious and need malacological expertise (Vinarski and Kramarenko, 2015). In this context, the use of more sensitive molecular detection approaches such as environmental DNA (eDNA) are promising (Bohmann et al., 2014).

Environmental DNA describes the DNA released by living or dead organisms in their environments (Taberlet et al., 2018). This complex and heterogeneous community of DNA fragments originating from all surrounding organisms is either free in the environment or associated with organic or inorganic particles in water, soil or atmosphere (Pedersen et al., 2015, Taberlet et al., 2012). The use of eDNA approaches for monitoring targeted freshwater snail species already exist to detect invasive species such as *Potamopyrgus antipodarum* and *Crepidula fornicata* (Goldberg et al., 2013, Miralles et al., 2019); or gastropod species that transmit parasitic diseases such as *Galba truncatula*, *Austropeplea tomentosa*, *Bulinus truncatus* and *Oncomelania hupensis* (Jones et al., 2018, Mulero et al., 2020, Fornillos et al., 2019). In such a biodiversity assessment context, only one eDNA tool have very recently been developed to characterise communities of freshwater bivalves (Prié et al., 2020). However, still is lacking a more general eDNA-based tool to characterise the entire malacofauna.



To fill this gap, we here propose a ready-to-use eDNA-based diagnostic tool for monitoring freshwater snail communities *in natura*. We will first describe our step-by-step procedure used to develop this tool. We will next present a field validation study conducted in the field that was assessed by comparing the snail communities characterised by our eDNA-based diagnostic tool to those obtained by visual malacological survey at 23 sites from 13 rivers widely distributed across Corsica Island (France). Based on our results, we provide an updated vision of the local malacofauna at the Island scale. Finally, we discuss the pros and cons of the emerging eDNA approaches compared to classical prospecting methods.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **1. Malacological survey and water sampling**

The field work was conducted during August and September 2018 in the Corsica Island. This summer end period fulfil optimal conditions for the presence of freshwater snails populations that reach their highest density (Kincaid-Smith et al., 2017). Overall a water sampling for eDNA and a malacological survey were performed at 23 sites distributed over 13 different rivers (Fig. 1) and (Table S1). These sites are annually monitored by the French agency “Agence Régionale de Santé” de Corse (ARS, 2019).

#### **1.1 Water sampling**

Water samples for subsequent eDNA analyses were collected before the malacological survey and following a previously optimised protocol (Mulero et al., 2020). At each sampling site, three litres of water were filtered once from the river streambed downstream the prospected site to capture flowing eDNA from upstream transects, covering potentially the overall gastropod communities at a given site, see Supp file 2 for details.



117

## 118 ***1.2 Malacological survey***

119 At each site, the malacological survey was achieved along a total of 300 meters by the same  
 120 operators. Three transects of 50 meters (downstream, at the referenced site and upstream)  
 121 were prospected along the two shores of the river (3 x 2 transects). Within each transect, all  
 122 freshwater snails were sampled manually or by scooping the grass on the water bench using a  
 123 colander. Snails were then grouped according to their morphology and taxonomically  
 124 identified at least at the genus, at best at the species level based on their morphological traits.  
 125 The number of individuals of each species was semi-quantitatively estimated. If more than  
 126 100 snails were collected, we have attributed a “>100” score to the given species. At each site,  
 127 GPS coordinates and several variables were collected including: the sampling day, the half  
 128 day of sampling (i.e. A.M. or P.M.), water temperature & pH, water flow and altitude.

129

## 130 **2. Molecular approaches**

131 All pre-PCR molecular steps were performed under a sterile PCR hood decontaminated  
 132 before and after each use as follow: the working surface was successively washed using 90%  
 133 ethanol, 10% bleach and a DNA AWAY™ solution (Thermo Scientific™) and then exposed to  
 134 UV light for 30 minutes. The reusable materials were decontaminated following the same  
 135 protocol as for the field sampling and treated under UV exposure for 30 minutes.

136

### 137 ***2.1 DNA extractions***

138 Total eDNA from each membrane was extracted using the DNeasy® Blood & Tissue kit  
 139 (QIAGEN) following an adapted protocol (Mulero et al., 2020). Briefly, membranes were

subdivided into four equal parts and extracted following the previously published protocol, see Supp file 2 for details.

In parallel, DNA was extracted from one individual of each of the 11 snail species collected during the malacological survey to produce a synthetic “mock community”. To this aim, we used the E.Z.N.A.® Tissue DNA kit (OMEGA bio-tek, Inc) following the “tissue protocol”. These snail DNA extractions were used as positive PCR and sequencing controls in the following steps.

To refine the molecular species assignments obtained from subsequent NGS analyses, we sequenced a 16S rRNA region for six snail species collected in Corsica. The 16Sbr-H primers were used following the PCR conditions described in (Saito et al., 2018). The resulting amplicons contain the barcode region used for the metabarcoding. The PCR products were then sequenced on an ABI 3730xl sequencer at the GenoScreen platform (Lille, France). Sequences were obtained for *Ancylus fluviatilis* (MT361136), *Gyraulus* sp. (MT361134), *Physa acuta* (MT361133), *Pisidium casertanum* (MT361132), *Theodoxus fluviatilis* (MT361131) and *Galba truncatula* (MT361135).

## 2.2 PCR primers

The primer pair used in this study (Gast01) was previously developed and tested *in silico* (Taberlet et al., 2018) but never tested and/or applied for empirical purposes. These primers target a 60-70 bp fragment of 16S mitochondrial rRNA. Based on their *in silico* analyses, these primers theoretically amplify at least 1,280 species distributed among 456 genera, mainly related to *Gastropoda*. In our study, we first validated that these primers were able to produce a size-expected amplicon using qPCR for the 11 snail species collected during the malacological survey and eight additional snail species from previous field works (Table 1). These 19 DNA extracts were amplified by qPCR on a LightCycler®480 qPCR device following the same protocol as for the first PCR step of the library preparation, see 2.3 below.

### 2.3 Library preparation and MiSeq amplicon sequencing

A total of 34 samples including the 23 filtration membranes from the 23 sampling sites, five negative controls and six positive controls were processed. Negative extraction controls consisted in ultrapure water samples processed following the same DNA extraction protocol as for the filtration membranes in each extraction runs ( $N = 2$ ). PCR negative controls consisted in PCR reactions performed using water as template in each PCR run ( $N = 3$ ). Positive controls consisted in two categories of mock communities. The first category consisted in an equimolar pool of 12 DNA extracts obtained from individuals of each snail species identified in Corsica and during previous field missions (Table 1). These mock communities are useful to detect PCR competition among different snail species. The second category of mock community consisted in pooling an equimolar quantity of PCR products individually obtained from 16 freshwater snail species (i.e. including the 11 identified snail species collected in Corsica and five additional non-endemic species bred in our laboratory). These controls are useful to detect possible biases during the sequencing process.

Individual libraries were generated for each membrane section of the 23 filtration membranes and for each control, hence, representing a total of 103 libraries (23 x 4 = 92 eDNA samples + 11 controls). NGS libraries were prepared following the Illumina two-step PCR protocol, using mitochondrial 16S primers with Illumina adapters for the first locus-specific PCR. Both PCR were performed using the NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> II Q5<sup>®</sup> Master Mix M0544L (NEW ENGLAND BioLabs, USA). The first PCR reactions were performed in a final volume of 35  $\mu$ l containing 3.5  $\mu$ l of extracted DNA (concentrations ranging from 0.05 ng/ $\mu$ l to 8.52 ng/ $\mu$ l), 17.5  $\mu$ l of 2X Q5 Master Mix and 14  $\mu$ l of indexed primer mix (final concentration 0.4  $\mu$ M) and ran on a Techne TC-PLUS thermal cycler PCR device (Techne, UK) using the following program: 98°C for 30 seconds followed by 40 cycles at 98°C for 10



seconds, 55°C for 20 seconds, 65°C for 8 seconds and a final elongation step of 2 minutes at 65°C. At this point, all PCR products were checked on a 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide after electrophoresis.

The PCR products were individually indexed in the second PCR step consisting in eight cycles using the Nextera<sup>™</sup> XT Index (Illumina, San Diego, USA) following the manufacturer's instructions. Finally, the libraries were normalised using SequalPrep<sup>™</sup> plates (Thermo Fischer Scientific, USA) before pooling. The pooled libraries were then purified following the JetSeq<sup>™</sup> Clean protocol (Bioline, UK), checked on a Bioanalyzer High Sensitivity DNA kit (Agilent, USA) and quantified using a Qubit fluorometric quantification (Thermo Fisher Scientific, USA). Paired-end sequencing (2 x 250 cycles) was performed with a MiSeq Reagent Kit v2 on an Illumina MiSeq<sup>™</sup> instrument at the Bio-Environnement platform (University of Perpignan Via Domitia, France).

### 3. Data analyses

#### 3.1 Bioinformatic pipeline

The resulting amplicon sequence dataset was processed using the Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution (FROGS) pipeline implemented in Galaxy (Escudie et al., 2018) at the Genotoul platform (Toulouse, France). (i) The amplicon dataset was first pre-processed, according to Gast01 primer specificities (i.e. amplicon size of 60 - 70 bp), we filtered out the sequences so as to keep amplicon sizes from 95 to 120 nucleotides (i.e. corresponding to the size of the targeted amplicon with Illumina adapters). (ii) The sequences kept were next clustered in operational taxonomic units (OTUs) using the swarm algorithm and using denoising and an aggregation distance of three nucleotides. (iii) The dataset was filtered out for chimeras using VSEARCH (Rognes et al., 2016). Singletons and underrepresented

clusters (i.e. <10 sequences) were removed. (iv) Each OTU was assigned to a species or taxon through a two-step MEGABLAST affiliation procedure. The first MEGABLAST analysis was restricted to *Mollusca* species. The second MEGABLAST analysis was performed without restricting parameters to check the robustness of the previous affiliations. The 10 best hits were kept for subsequent analysis. (v) The resulting OTUs were filtered following two criteria: first, only OTUs presenting a minimal blast coverage of 84% of amplicon length were kept; second, only OTUs presenting a pairwise identity above 89% with the affiliated sequence were kept. The remaining OTUs were considered as “unassigned”.

Lastly, to confirm that a given OTU was detected in a specific sample, we have adapted our validation criteria depending on OTUs abundances. An abundant OTU (i.e.  $\geq 1000$  copies considering all the samples) was considered present in a specific membrane when reaching at least 10 copies (overall the four membrane sections). Regarding poorly abundant OTU (i.e. < 1000 copies considering all the samples), we considered a sample positive if four or more copies of such OTU were distributed among two quarters of a same membrane.

## RESULTS

Environmental variables for the 23 sites are presented in (Table S1). All of these sites were lotic ecosystems, pH values ranged from 7.33 to 8.7, temperatures ranged from 16.5°C to 26.7°C and elevation ranged from 4 m to 558 m.



## 1. Malacological survey

Overall, 11 distinct freshwater snail species were identified among the 23 sampled sites (Table 1-S3). These species were already registered in Corsica (INPN, 2020, IUCN, 2020) where 18 species of freshwater mollusc have been described so far, five of which inhabiting lentic ecosystems (Table S3) and (Mouthon, 1982, INPN, 2020). The species richness ranged from one (site 4) to six (site 23). The most common species was *P. antipodarum* (22/23 sites) and the rarest were *T. fluviatilis* (1/23 sites) and *Bithynia tentaculata* (3 individuals at site 13). Among the species identified, two are invasive (i.e. *P. antipodarum* and *P. acuta*) and two are intermediate hosts for Human and livestock parasites (i.e. *B. truncatus* and *G. truncatula*). Our semi-quantitative approach showed that *P. antipodarum* and *A. fluviatilis* were the most abundant species with  $48.03 \pm 46.38$  and  $26.68 \pm 40.53$  individuals, respectively (Table 1).

## 2. Molecular results

Over the 19 snail DNA extracts tested in qPCR with metabarcoding primers (Table 1), all but *P. casertanum* were positive. Regarding the equimolar pools of DNA, whatever pre- (Fig. S4a) or post-PCR (Fig. S4b) the sequencing of equimolar pools gave a number of reads for each species fitting to the expected ratio. This was higher evenness for post-PCR pools.

Despite all our precautions, four among the 23 eDNA water samples (from sites 10, 13, 18 and 19 – see Fig. 1) were possibly contaminated and were thus discarded. In fact, amplicons corresponding of *A. fluviatilis*, *G. truncatula* and *B. truncatus* were found in the negative PCR controls associated with these samples.

Excluding the four contaminated sites, the whole sequencing (controls + field samples) generated more than 14 M of clusters with an average of 97,000 sequences per library. After analyses, 8.7 M of sequences were affiliated (Fig. 2). These sequences were grouped among

488 OTUs with 43 OTUs corresponding to *Mollusca* species. After removing the sequences from control samples, on the 7,290,067 remaining sequences, 6% (445,638) were affiliated to *Mollusca*; 10% (715,308) were unaffiliated and 84% (6,129,121) were affiliated to non-mollusc species (Fig. 2). Whatever the taxonomic group, the OTU affiliations were generally limited to the genus and rarely reached the species level (e.g. only four out of 11 freshwater snail species found by metabarcoding were affiliated to a single species name). However, the 16S sequences obtained from snail DNA extracts collected in Corsica, allowed to recover the corresponding species name for major *Mollusca* OTUs. All the genus or species detected using eDNA corresponded to species already identified in Corsica and no new genus was detected compared to our malacological survey. Hence, considering all prospected sites, we detected 61.1% (11/18) of historically known freshwater molluscs in Corsica and 84.6% (11/13) of species occurring in lotic systems (Table S3) and (INPN, 2020, Mouthon, 1982). The detected snail species belong to three subclasses of the *Gastropoda* (i.e. *Neritimorpha*, *Caenogastropoda*, and *Heterobranchia*) (Fig. 3). The non-detected subclasses (e.g. *Vetigastropoda* and *Patellogastropoda*) are related to marine snail species. Beyond gastropods species, the present protocol allowed the detection of the bivalve *P. casertanum*.

### 3. Comparing the malacological survey to the eDNA monitoring

The malacological survey and the eDNA monitoring provided very similar results (Figs 3-4.). At the Island scale, all species identified during the malacological survey were also detected by eDNA monitoring. For some species such as the two *Gyraulus* species, the eDNA monitoring accuracy was limited to the genus level.

At the site level, the eDNA monitoring confirmed the detections obtained by malacological survey for 97.1% (67/69) of the detections. Only two occurrences of *A. fluviatilis* (site 17) and *Gyraulus* sp. (site 20) detected visually during the malacological

survey, were not detected by eDNA monitoring (Fig. 4). Conversely, the malacological survey confirmed the detections obtained by eDNA monitoring for 77% (67/87) of the detections (Fig. 4). Moreover, eDNA monitoring detected on average  $1.8 \pm 2.84$  more species per site than the malacological survey although this difference was not significant (Wilcoxon rank test;  $W = 24$ ,  $P = 0.11$ ). Based on the eDNA approach, *B. truncatus* was detected at 11 sites while only visually detected at 4 sites (Figs 4-5a.). At the river scale, the results obtained from direct malacological survey and from the eDNA monitoring approach gave even more congruent results (Fig. 3).

Among all the freshwater species detected in Corsica, two species are hosts for the transmission of trematode of medical and veterinary importance (i.e. *B. truncatus*, Fig. 5a and *G. truncatula*, Fig. 5b) and two other are invasive species (i.e. *P. antipodarum*, Fig. 5c and *P. acuta*, Fig. 5d). The two invasive species display a wide distribution range (17 and 9 sites among the 19 monitored sites irrespective of the method) while the two species of medical/veterinary importance were mainly distributed in the Southern part of the Island.

## DISCUSSION

One of the key steps for monitoring ecosystems and to quantify the effect of anthropogenic activities on biodiversity is to develop new tools enabling rapid and exhaustive characterisation of the overall intrinsic species diversity. This is particularly true for freshwater ecosystems that undergo rapid changes and that are particularly threatened nowadays (Carpenter et al., 2011). So far, the use of environmental DNA (eDNA) has been shown to be an efficient tool for monitoring fish (Hanfling et al., 2016), arthropod (Krol et al., 2019) and bivalve (Prié et al., 2020) communities in freshwater environments. Here, we



present the first application of an eDNA monitoring method enabling the non-invasive characterisation of entire malacofauna from freshwater samples.

### **Benchmarking the eDNA monitoring**

Our comparative approach between a classical (i.e. visual) prospection and an eDNA-based malacological survey highlights the remarkable ability of eDNA to characterise malacofauna from water samples. Considering the 19 sites successfully diagnosed, 97.1% (67/69) of total occurrences reported by the malacological survey were confirmed using eDNA monitoring. A noticeable benefit of eDNA approaches compared to malacological survey is the less time-consuming sampling effort needed per site; only one sample of three litres realised by one operator ( $\approx$  30 minutes from sampling to sample preservation) is needed (Mulero et al., 2020). In comparison, the time needed to realise six measure units in classical malacological survey is much longer ( $>2$  hours) depending on field practicability and experimenter skill level. Moreover, provided that the molecular databases are well documented and free of false molecular taxonomic assignments, the eDNA based approach can provide insights on gastropod diversity at a given site without having malacological expertise. In the present study, we did not try to optimise the volume of water sampled. However, in the case of larger sampling campaigns it might be interesting to determine the lowest volume of water necessary to ensure the same diagnosis efficiency. We recently shown, using a targeted approach, that lower water volumes down to one litre allows detecting *B. truncatus* without losses in efficacy (Mulero et al., 2020).

Using the eDNA monitoring approach, we tended to detect more species per site than with the malacological survey. Indeed, over the 87 detection events found using the eDNA monitoring, 77% of them (67) were corroborated by visual observations during the malacological survey. This apparent higher richness found by eDNA metabarcoding approach compared to classical survey was already reported in previous studies (Deiner et al., 2017,

Hanfling et al., 2016, Prié et al., 2020). Three non-exclusive hypotheses could explain the higher efficacy of eDNA compare to classical methods. First, DNA transportation through the river flow allows collecting eDNA from upstream the targeted site. In fact, in lotic systems, eDNA is known to disperse in a given way with waterflow (Hanfling et al., 2016). Thus, in lotic systems and depending on the prospected scale, this dispersing property can be favourable for detecting snail communities at a river section scale, but potentially a limiting factor when focusing at the site scale. Second, eDNA-based methods are expected to outcompete visual surveys for detecting cryptic or rare species (e.g. Dejean et al., 2012). Cryptic freshwater mollusc species are particularly difficult to detect and previous studies estimated that about 20% of the species present at a single site are undetected after a single prospecting session during malacological surveys (Dubart et al., 2019). Moreover, detecting biases are also common in malacology because populations of snails are highly dynamic in space and time (Lamy et al., 2012). Interestingly, our eDNA approach has been particularly useful to detect *P. casertanum* compared to classical malacological survey, this species being known to be difficult to detect visually because of his preferred niche (i.e. under boulders) and its small size. Third, false positives constitute one major limitation of eDNA-based protocols (Cristescu and Hebert, 2018). These biases are generally related to either primer amplification biases or inappropriate field and/or laboratory protocols (Cristescu and Hebert, 2018). Regarding primer amplification biases, further applications of the current tool are needed to evaluate these errors considering that it is impossible to test the primers with the DNA of all known organisms *in vitro*. In our study, such biases are likely to be limited because our controlled mock communities were detected with no apparent amplification & sequencing biases between species. Concerning DNA contamination, the four sites that could have been contaminated were discarded, moreover, the detections found using eDNA monitoring yet not confirmed by malacological survey, followed an ecologically realistic distribution. For *G.*



*truncatula*, the two sites found positive only by eDNA monitoring were distributed on the Gravona River, downstream from a site where *G. truncatula* was detected by the two approaches (i.e. site 5). The two other sites were distributed on the Rizzanese river in which *Lymnaeid* snails hosts of *F. hepatica* were previously identified (Gretillat, 1963). Noteworthy, this species prefers temporary water body, but could be found in river shore and associated trickle (Dreyfuss et al., 2009), which might explain the observed relatively low densities.

Regarding *B. truncatus*, the detection differences are the most noticeable between the two approaches, the seven additional sites were mainly distributed in the Gravona River and nearby rivers. Even if these non-randomly distributed detections support rather the non-detection of certain species by malacological survey, than false positive eDNA detection, a thorough field survey of these rivers is needed to validate our results.

# **Environmental DNA for characterising communities**

The present eDNA metabarcoding protocol allowed to qualitatively characterise the Corsican malacofauna at global scale. However, as shown in previous eDNA-based metabarcoding studies, the accuracy of such characterisation highly depends on the reliability of currently available databases together with sequence size that sometimes results in a limitation for the taxonomic affiliation to the genus taxonomic level especially for closely related species (Krol et al., 2019, Deiner et al., 2017). Here, we couldn't distinguish the two distinct species belonging to the *Gyraulus* genus identified visually. These species could also be difficult to differentiate morphologically, that could explain confusions with *Planorbis planorbis* on public NCBI databases. At the eDNA era, such limitations clearly call for the improvement and reinforcement of public databases aiming at characterising biodiversity at the taxonomic and molecular scale (Balint et al., 2018). To this end, we submitted 6 new 16S rRNA sequences of freshwater snail species identified in Corsica. However, to overcome these limitations in the immediate future, Krol et al., (2019) recently suggested to use a combination

of barcode to optimise taxonomic assignation. Recent studies also called for the need of reinforcing the collection of metadata in eDNA studies that could influence the detection of eDNA (Nicholson et al., 2020). In this way, we collected environmental variables at all sampling sites including some that are generally neglected (e.g. pH, waterflow, water temperature; Nicholson et al., 2020). However, the sampling of a wider diversity of freshwater environment is still needed to accurately assess the effect of these variables on our ability to detect species.

### **Environmental DNA for the risk assessment of parasitic diseases**

Beyond the technological development, our study provides an updated picture of the distribution of malacological communities in Corsica. Among the 11 species detected, two snail species are of medical/veterinary importance. An updated distribution map for these two species is of prime interest for determining the risk of the associated waterborne diseases. In particular, in 2013 an outbreak of Schistosomiasis emerged in Corsica, this disease being caused by a trematode parasite using *B. truncatus* as host (Boissier et al., 2016, Ramalli et al., 2018). *Bulinus truncatus* was widely distributed in Corsica in the middle of the 20<sup>th</sup> century and at this time some authors warned authorities about the potential for such a local emergence of Schistosomiasis. Today, this species is mainly established in three rivers in Southern Corsica (Cavu, Solenzara and Osu). Using our eDNA monitoring tool, we detected the presence of *B. truncatus* in the Gravona River, although possibly at low densities and/or upstream the sampled sites. This result call for an urging field validation of the local presence of this species to prevent potential transmission to Humans in this highly frequented river near Ajaccio, the main agglomeration of Corsica.

*Fasciola hepatica* is another trematode species already present in Corsica that uses *G. truncatula* as intermediate host (Oviedo et al., 1996). This parasite is responsible for the zoonotic Fasciolosis disease generally infecting livestock and Humans (Valero et al., 2002).

The present study provides an up-to-date geographic distribution of *G. truncatula* in Corsica, hence, delineating pastures presenting a potential risk of transmission to livestock and Humans. Interestingly, the eDNA monitoring tool also detected the presence of *G. truncatula* in the Rizzanese River, a region in which lymnaeids snails hosts of *F. hepatica* were previously identified (Gretillat, 1963) although not locally detected by visual inspection in this study. In a sanitary context, these results also call for thorough monitoring of this species in this particular river.

# **Environmental DNA for studying bioinvasions**

In a bioinvasion context, we were able to detect two invasive snail species: *P. antipodarum* originating from New Zealand (Goldberg et al., 2013) and introduced in Europe in 1859 probably with human activities such as fish farming and through ballast waters (Alexandre da Silva et al., 2019). This parthenogenetic snail is widely distributed in Corsica and needs attention considering the important density that these populations can reach (>400,000/m<sup>2</sup>). Consequently, this snail species is known to negatively impact nutrient cycling or can competitively exclude native species in invaded ecosystems (Goldberg et al., 2013).

*Physa acuta* is another invasive freshwater snail species originating from North America (Vinarski, 2017) that has invaded Europe likely through the activity of aquarium keepers and maritime trade (Vinarski, 2017). As for *P. antipodarum* this species needs attention as it can drastically disturb the receiving ecosystems and impact the ecology of indigenous species by overconsuming primary producers.

# **Authors Contributions**



JB., OR. and SM. conceived the study and the sampling design. AL., MZ., JF., YQ and SM. carried out the malacological survey and the field sampling. SM., JFA. and ET. processed the samples and performed molecular experiments and amplicon sequencing. SM., JB., OR. and ET., analysed and interpreted the data. JPP. provided the malacological expertise. SM., JB. and OR. drafted the manuscript. JB., OR., SM., ET., AL., MZ., JFA., JF., YQ. and JPP. revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We thank the French agency “Agence Régionale de Santé de Corse” (ARS) for the data relative to the prospected sites. This study is set within the framework of the “Laboratoire d’Excellence (LABEX)” TULIP (ANR-10-LABX-41).

## Disclosures

Authors declare that they have no competing interests.

## Availability of data and materials

The dataset supporting the conclusions of this article is included within the article.

## REFERENCES

Alexandre Da Silva, M. V., Nunes Souza, J. V., Souza, J. R. B. & Vieira, L. M. 2019. Modelling species distributions to predict areas at risk of invasion by the exotic aquatic New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray 1843). *Freshwater Biology*, 64, 1504-1518. doi: 10.1111/fwb.13323



- ARS. 2019. *Qualité des eaux de baignade* [Online]. French minister for Solidarity and Health: French minister for Solidarity and Health. Available: <http://baignades.sante.gouv.fr/baignades/navigMap.do?idCarte=fra#a> [Accessed November 28, 2019 2019].
- Balint, M., Nowak, C., Marton, O., Pauls, S. U., Wittwer, C., Aramayo, ... Jansen, M. 2018. Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Mol Ecol Resour*, 18, 1415-1426. doi: 10.1111/1755-0998.12934
- Blettler, M. C. M., Abrial, E., Khan, F. R., Sivri, N. & Espinola, L. A. 2018. Freshwater plastic pollution: Recognizing research biases and identifying knowledge gaps. *Water Res*, 143, 416-424. doi: 10.1016/j.watres.2018.06.015
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., ... De Bruyn, M. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol Evol*, 29, 358-67. doi: 10.1016/j.tree.2014.04.003
- Boissier, J., Grech-Angelini, S., Webster, B. L., Allienne, J. F., Huyse, T., Mas-Coma, S., ... Mita, G. 2016. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect Dis*, 16, 971-9. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00175-4
- Bouchet, P., Falkner, G. & Seddon, M. B. 1999. Lists of protected land and freshwater molluscs in the Bern Convention and European Habitats Directive: are they relevant to conservation? *Biological Conservation*, 90, 21-31.
- Carpenter, S. R., Stanley, E. H. & Vander Zanden, M. J. 2011. State of the World's Freshwater Ecosystems: Physical, Chemical, and Biological Changes. *Annual Review of Environment and Resources*, 36, 75-99. doi: 10.1146/annurev-environ-021810-094524
- Cristescu, M. E. & Hebert, P. D. N. 2018. Uses and Misuses of Environmental DNA in Biodiversity Science and Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 209-230. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306
- Cunha, T. J. & Giribet, G. 2019. A congruent topology for deep gastropod relationships. *Proc Biol Sci*, 286, 20182776. doi: 10.1098/rspb.2018.2776
- Deiner, K., Bik, H. M., Machler, E., Seymour, M., Lacoursiere-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., ... & Bernatchez, L. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol Ecol*, 26, 5872-5895. doi: 10.1111/mec.14350
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49, 953-959. doi: 10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x
- Dillon, R. T. 2000. Predation. *The Ecology of Freshwater Molluscs*. Cambridge: Cambridge University Press. doi: 10.1017/cbo9780511542008.008
- Dreyfuss, G., Vareille-Morel, V. & Rondelaud, D. 2009. Les habitats de *Lymnaea truncatula* Müller (Mollusque) le long de deux rivières. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 33, 67-72. doi: 10.1051/limn/1997009
- Dubart, M., Pantel, J. H., Pointier, J. P., Jarne, P. & David, P. 2019. Modeling competition, niche, and coexistence between an invasive and a native species in a two-species metapopulation. *Ecology*, 100, e02700. doi: 10.1002/ecy.2700

- Escudie, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., ... Pascal, G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34, 1287-1294. doi: 10.1093/bioinformatics/btx791
- Fornillos, R. J. C., Sato, M. O., Tabios, I. K. B., Sato, M., Leonardo, L. R., Chigusa, Y., ... Fontanilla, I. K. C. 2019. Detection of *Schistosoma japonicum* and *Oncomelania hupensis quadrasi* environmental DNA and its potential utility to schistosomiasis japonica surveillance in the Philippines. *PLoS One*, 14, e0224617. doi: 10.1371/journal.pone.0224617
- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J. & Waits, L. P. 2013. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32, 792-800. doi: 10.1899/13-046.1
- Gretillat, S. 1963. [Epidemiology of Certain Trematode Diseases of Domestic Animals in Corsica (Bovine Bilharziosis and Bovine and Ovine Distomiasis). Observations Conducted during a Mission Accomplished during the Autumn of 1962]. *Ann Parasitol Hum Comp*, 38, 471-81.
- Hanfling, B., Lawson Handley, L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., ... Winfield, I. J. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol Ecol*, 25, 3101-19. doi: 10.1111/mec.13660
- Hill, W. R. & Griffiths, N. A. 2017. Nitrogen processing by grazers in a headwater stream: riparian connections. *Freshwater Biology*, 62, 17-29. doi: 10.1111/fwb.12833
- INPN. 2020. *National Inventory of Natural Heritage* [Online]. Muséum national d'Histoire naturelle. Available: <https://inpn.mnhn.fr> [Accessed February 11 2020].
- IUCN. 2020. *International Union for Conservation of Nature* [Online]. International Union for Conservation of Nature. Available: [www.iucn.org](http://www.iucn.org) [Accessed February 10 2020].
- Janssen, J. A. M., Rodwell, J. S., Garcia-Criado, S., Gubbay, S., Haynes, T., Nieto, A., ... Valachovič, M. 2016. European Red List of Habitats Part 2. Terrestrial and freshwater habitats. *European Publications Office*, 2. doi: 10.2779/091372
- Johnson, P. D., Bogan, A. E., Brown, K. M., Burkhead, N. M., Cordeiro, J. R., Garner, J. T., ... Strong, E. E. 2013. Conservation status of freshwater gastropods of Canada and the United States. *Fisheries*, 38, 247-282.
- Jones, R. A., Brophy, P. M., Davis, C. N., Davies, T. E., Emberson, H., Rees Stevens, P. & Williams, H. W. 2018. Detection of *Galba truncatula*, *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* environmental DNA within water sources on pasture land, a future tool for fluke control? *Parasit Vectors*, 11, 342. doi: 10.1186/s13071-018-2928-z
- Kier, G., Kreft, H., Lee, T. M., Jetz, W., Ibisch, P. L., Nowicki, C., ... Barthlott, W. 2009. A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9322-7. doi: 10.1073/pnas.0810306106
- Kincaid-Smith, J., Rey, O., Toulza, E., Berry, A. & Boissier, J. 2017. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. *Trends Parasitol*, 33, 600-609. doi: 10.1016/j.pt.2017.04.009
- Krol, L., Van Der Hoorn, B., Gorsich, E. E., Trimbos, K., Bodegom, P. M. V. & Schrama, M. 2019. How Does eDNA Compare to Traditional Trapping? Detecting Mosquito



- Communities in South-African Freshwater Ponds. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. doi: 10.3389/fevo.2019.00260
- Lamy, T., Pointier, J. P., Jarne, P. & David, P. 2012. Testing metapopulation dynamics using genetic, demographic and ecological data. *Mol Ecol*, 21, 1394-410. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05478.x
- Longmire, J. L., Maltbie, M. & Baker, R. J. 1997. Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections. Museum of Texas Tech University.
- Lu, X. T., Gu, Q. Y., Limpanont, Y., Song, L. G., Wu, Z. D., Okanurak, K. & Lv, Z. Y. 2018. Snail-borne parasitic diseases: an update on global epidemiological distribution, transmission interruption and control methods. *Infect Dis Poverty*, 7, 28. doi: 10.1186/s40249-018-0414-7
- Lydeard, C., Cowie, R. H., Ponder, W. F., Bogan, A. E., Bouchet, P., Clark, S. A., ... Thompson, F. G. 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, 54, 321-330.
- Mahmoud, K. M. A. & Abu Taleb, H. M. A. 2013. Fresh water snails as bioindicator for some heavy metals in the aquatic environment. *African Journal of Ecology*, 51, 193-198.
- Miralles, L., Parrondo, M., Hernandez De Rojas, A., Garcia-Vazquez, E. & Borrell, Y. J. 2019. Development and validation of eDNA markers for the detection of *Crepidula fornicata* in environmental samples. *Mar Pollut Bull*, 146, 827-830. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.07.050
- Mouthon, J. 1982. Les mollusques dulcicoles - Données biologiques et écologiques - Clés de détermination des principaux genres de bivalves et de gastéropodes de France. *Bulletin Français de Pisciculture*, 1-27. doi: 10.1051/kmae:1982001
- Mulero, S., Boissier, J., Allienne, J., Quilichini, Y., Foata, J., Pointier, J. & Rey, O. 2020. Environmental DNA for detecting *Bulinus truncatus*: A new environmental surveillance tool for schistosomiasis emergence risk assessment. *Environmental DNA*, 2, 161-174. doi: 10.1002/edn3.53
- Nicholson, A., McIsaac, D., Macdonald, C., Gec, P., Mason, B. E., Rein, W., ... Hanner, R. H. 2020. An analysis of metadata reporting in freshwater environmental DNA research calls for the development of best practice guidelines. *Environmental DNA*. doi: 10.1002/edn3.81.
- Oviedo, J. A., Bargues, M. D. & Mas-Coma, S. 1996. The intermediate snail host of *Fasciola hepatica* on the mediterranean island of Corsica. *A.P.E.*, 56, 217-220.
- Parmesan, C. & Yohe, G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421, 37-42. doi: 10.1038/nature01286
- Pedersen, M. W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Sarkissian, C. D., Haile, J., Hellstrom, M., ... Willerslev, E. 2015. Ancient and modern environmental DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370, 20130383. doi: 10.1098/rstb.2013.0383
- Prié, V., Valentini, A., Lopes-Lima, M., Froufe, E., Rocle, M., Poulet, N., Taberlet, P. & Dejean, T. 2020. Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*. doi: 10.1007/s10750-020-04260-8.
- Ramalli, L., Mulero, S., Noel, H., Chiappini, J. D., Vincent, J., Barre-Cardi, H., ... Boissier, J. & Berry, A. 2018. Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in

- southern Corsica since 2013. *Euro Surveill*, 23, 2-5. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahe, F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. doi: 10.7717/peerj.2584
- Saito, T., Hirano, T., Prozorova, L., Tu Do, V., Sulikowska-Drozdz, A., Sitnikova, T., ... Fukuda, H. & Chiba, S. 2018. Phylogeography of freshwater planorbid snails reveals diversification patterns in Eurasian continental islands. *BMC Evol Biol*, 18, 164. doi: 10.1186/s12862-018-1273-3
- Strayer, D. L. & Dudgeon, D. 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29, 344-358. doi: 10.1899/08-171.1
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. & Coissac, E. 2018. *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*, Oxford, UK, Oxford University Press.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Mol Ecol*, 21, 1789-93. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x
- Tallarico, L. D. F. 2016. Freshwater Gastropods as a Tool for Ecotoxicology Assessments in Latin America\*. *American Malacological Bulletin*, 33, 330-336. doi: 10.4003/006.033.0220
- Valero, M. A., Panova, M., Comes, A. M., Fons, R. & Mas-Coma, S. 2002. Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. *J Parasitol*, 88, 308-13. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0308:PISASO]2.0.CO;2
- Vinarski, M. V. 2017. The history of an invasion: phases of the explosive spread of the physid snail *Physella acuta* through Europe, Transcaucasia and Central Asia. *Biological Invasions*, 19, 1299-1314. doi: 10.1007/s10530-016-1339-3
- Vinarski, M. V. & Kramarenko, S. S. 2015. How does the discrepancies among taxonomists affect macroecological patterns? A case study of freshwater snails of Western Siberia. *Biodiversity and Conservation*, 24, 2079-2091. doi: 10.1007/s10531-015-0934-4
- Waldron, A., Miller, D. C., Redding, D., Mooers, A., Kuhn, T. S., Nibbelink, N., Roberts, J. T., Tobias, J. A. & Gittleman, J. L. 2017. Reductions in global biodiversity loss predicted from conservation spending. *Nature*, 551, 364-367. doi: 10.1038/nature24295

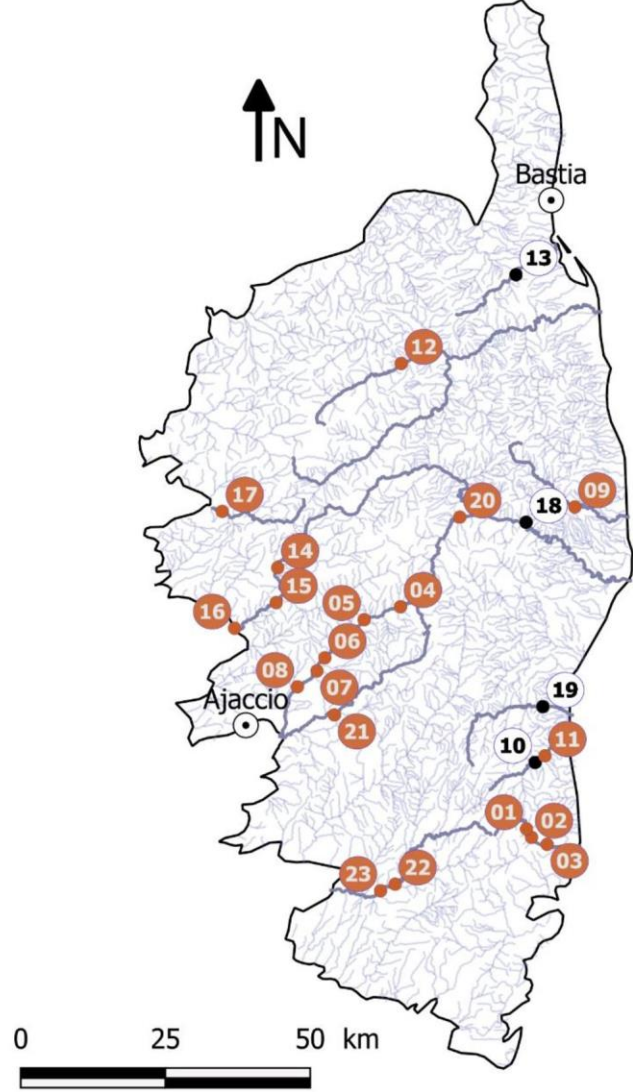


## Figure and tables

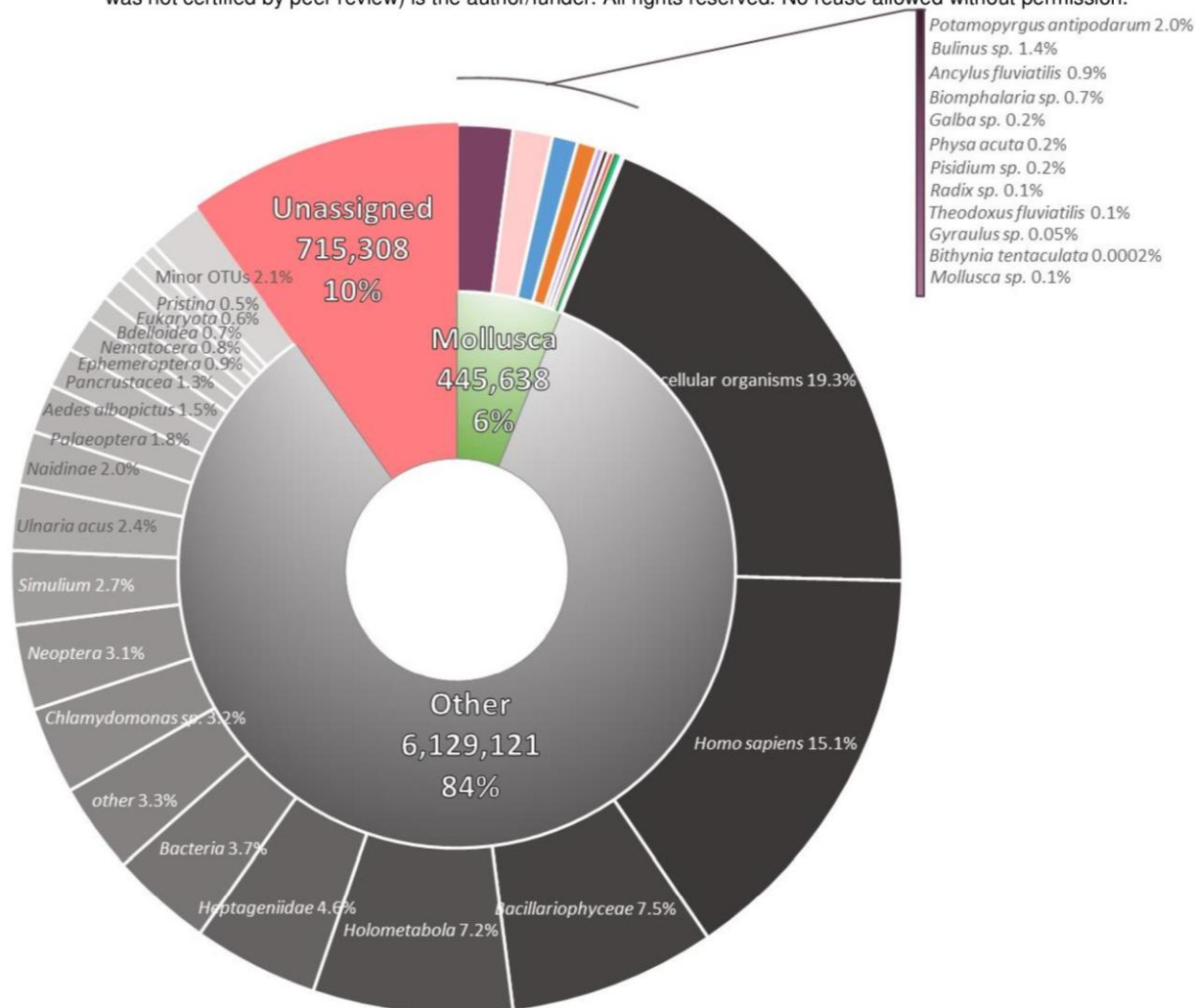
**Table 1.** Snail species used for assessing the detection range of the Gast01 PCR primers *in vitro*.

| Snail species                                  | Origin          | Date | Provided by                                 | Average headcount per site            |
|------------------------------------------------|-----------------|------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Bulinus forskalii</i>                       | South-Africa    | 2017 | Huyse T., KU Leuven, Belgium                | –                                     |
| <i>Bulinus globosus</i>                        | Senegal         | 2012 | Huyse T., KU Leuven, Belgium                | –                                     |
| <i>Bulinus africanus</i>                       | South-Africa    | 2017 | Huyse T., KU Leuven, Belgium                | –                                     |
| <i>Radix natalensis</i> <sup>a,b</sup>         | South-Africa    | 2017 | Huyse T., KU Leuven, Belgium                | –                                     |
| <i>Galba schirazensis</i> <sup>a,b</sup>       | Cuba            | 2013 | Hurtrez-Boussès S., IRD Montpellier, France | –                                     |
| <i>Galba cubensis</i> <sup>a,b</sup>           | Cuba            | 2013 | Hurtrez-Boussès S., IRD Montpellier, France | –                                     |
| <i>Pseudosuccinea columella</i> <sup>a,b</sup> | France          | 2011 | Hurtrez-Boussès S., IRD Montpellier, France | –                                     |
| <i>Biomphalaria glabrata</i> <sup>a,b</sup>    | Brazil          | 2018 |                                             | –                                     |
| <i>Bulinus truncatus</i> <sup>a,b</sup>        | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>2.28</b> (± 13.95) from 0 to >100  |
| <i>Bithynia tentaculata</i> <sup>b</sup>       | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>0.02</b> (± 0.28) from 0 to 3      |
| <i>Radix balthica</i> <sup>b</sup>             | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>0.11</b> (± 1.21) from 0 to 13     |
| <i>Ancylus fluviatilis</i> <sup>a,b</sup>      | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>26.68</b> (± 40.53) from 0 to >100 |
| <i>Galba truncatula</i> <sup>b</sup>           | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>0.06</b> (± 0.38) from 0 to 3      |
| <i>Gyraulus laevis</i> <sup>a,b</sup>          | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>0.06</b> (± 0.34) from 0 to 3      |
| <i>Gyraulus</i> sp. <sup>a,b</sup>             | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>2.99</b> (± 8.66) from 0 to 50     |
| <i>Physa acuta</i> <sup>a,b</sup>              | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>17.38</b> (± 34.29) from 0 to >100 |
| <i>Potamopyrgus antipodarum</i> <sup>a,b</sup> | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>48.03</b> (± 46.38) from 0 to >100 |
| <i>Pisidium casertanum</i> <sup>a,b</sup>      | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>1.45</b> (± 7.10) from 0 to 50     |
| <i>Theodoxus fluviatilis</i> <sup>b</sup>      | Corsica, France | 2018 |                                             | <b>0.87</b> (± 5.26) from 0 to 50     |

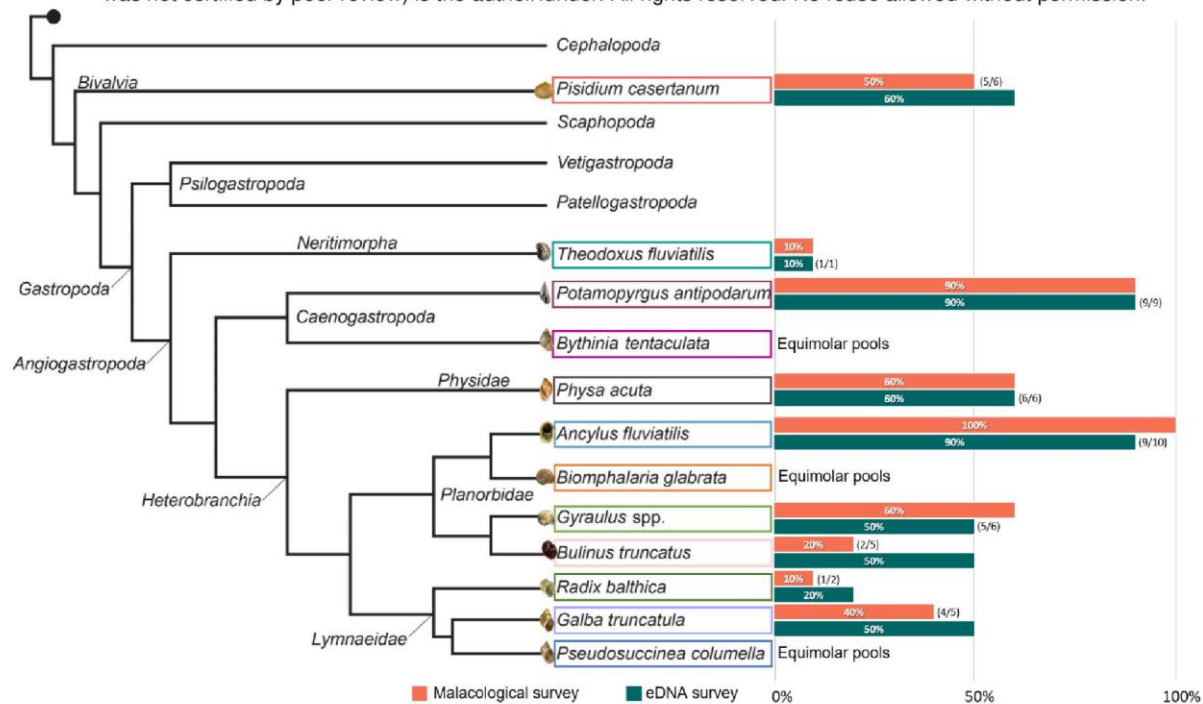
<sup>a</sup>DNA extracts used for the preparation of equimolar pools of DNA (N = 12). <sup>b</sup>DNA extracts used for the preparation of equimolar pools of PCR products (N = 16). The displayed median headcount for each species reported by the malacological survey consider the six measure units conducted on each sites as separate values.



**Figure 1.** Map referencing the 23 sites prospected across Corsica Island for malacological survey and for water eDNA sampling. All these sites are lotic and distributed among 13 different rivers (darker lines). These sites are annually monitored by the French agency ARS, see (Table S1) for coordinates and environmental variables. The sites in black were sampled but removed from the analysis due to potential DNA contaminations (see text for details).



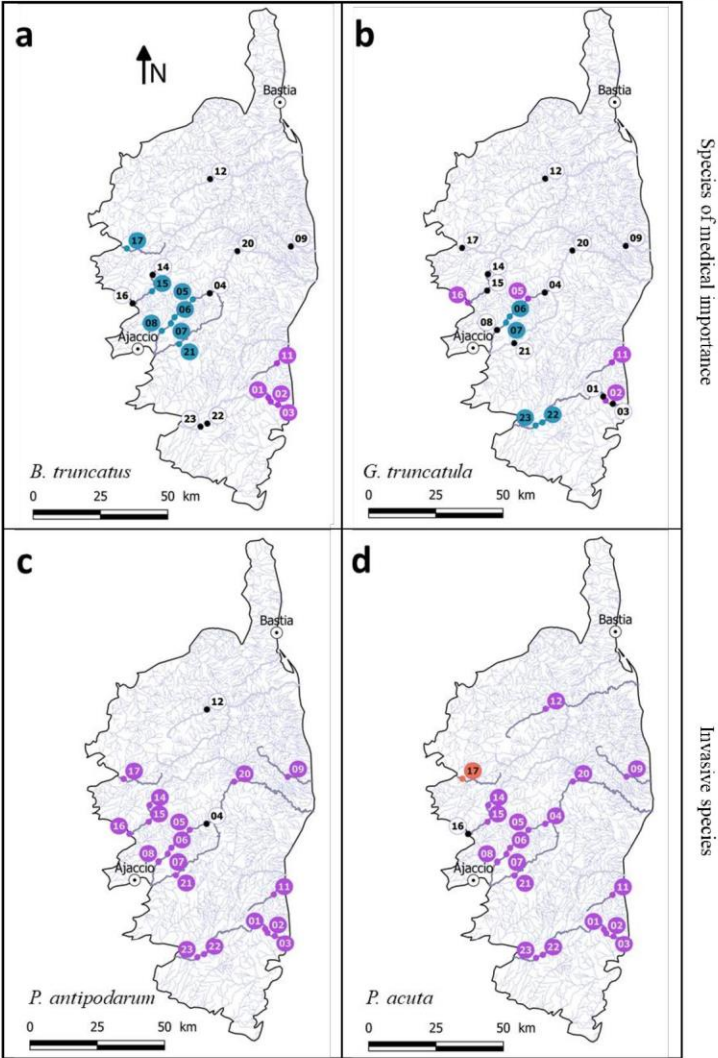
**Figure 2.** Major OTUs ranking based on sequence abundances. These sequences were obtained from eDNA samples collected in the field and do not contain those from experimental controls. Each taxon is based on merged OTUs (i.e. all OTUs affiliated to a same species are merged in one category).



**Figure 3.** Simplified phylogeny of molluscs from Cunha & Giribet, 2019 highlighting all species reported in Corsica Island during the present study and species used to test primers (mock communities). Horizontal barplots represent species occurrences recorded at the river scale (N = 10) based on the malacological survey (in orange) and on the eDNA metabarcoding results (in blue). Numbers into brackets show the number of rivers positives for both methods on the total of positive rivers for the method showing the highest number of positive for a given species.







**Figure 5.** Maps displaying the distribution of freshwater snail species of medical and veterinary (top panels) and ecological interest (down panels), **a.** *Bulinus truncatus*, an intermediate host of the urogenital schistosomiasis infecting Humans; **b.** *Galba truncatula*, an intermediate host of the liver fluke infecting livestock and Humans; **c.** *Potamopyrgus antipodarum* is an invasive snail species from New Zealand and **d.** *Physa acuta* is an invasive snail species from North America. Black dot are sites where the given species is absent based on the two monitoring methods; Purple circles are sites where the given species was detected with the two monitoring methods; Blue circles are sites where the given species was detected using the eDNA monitoring approach only; Orange circles are sites where the given species was detected using the malacological survey only.

## Supporting information (Publication 5)

**(Publication 5) Table S1.** Environmental variables and geographical coordinates (using WGS 84 projection) for each of the prospected sites.

| Site IDs | River        | Coordinates (DD) |          | Sampling Date | Water flow     | T (°C) | pH   | Altitude (m) |
|----------|--------------|------------------|----------|---------------|----------------|--------|------|--------------|
| 1        | Cavu         | 41.731388        | 9.293333 | 26/09/18 - am | low to strong  | 18.8   | 8.7  | 157          |
| 2        | Cavu         | 41.72            | 9.301666 | 26/09/18 - am | medium         | 20     | 8.5  | 124          |
| 3        | Cavu         | 41.704444        | 9.334722 | 26/09/18 - pm | strong         | 21.5   | 8.3  | 61           |
| 4        | Gravona      | 42.093265        | 9.067898 | 20/08/18 - am | low            | 16.5   | 7.41 | 558          |
| 5        | Gravona      | 42.077132        | 8.99049  | 20/08/18 - am | low to strong  | 17.3   | 7.6  | 341          |
| 6        | Gravona      | 42.003029        | 8.884666 | 17/08/18 - am | low to medium  | 20.8   | 7.95 | 113          |
| 7        | Gravona      | 42.023167        | 8.903336 | 17/08/18 - pm | none to low    | 21.6   | 7.96 | 172          |
| 8        | Gravona      | 41.981789        | 8.841893 | 23/08/18 - am | low to strong  | 20.9   | 7.87 | 65           |
| 9        | La Bravone   | 42.225705        | 9.446491 | 04/08/18 - am | low            | 22.5   | 8.31 | 84           |
| 10       | La Solenzara | 41.8348          | 9.319537 | 31/07/18 - pm | low            | 26.7   | 7.68 | 114          |
| 11       | La Solenzara | 41.843611        | 9.343333 | 27/09/18 - am | low to strong  | 19.5   | 8.3  | 62           |
| 12       | L'Asco       | 42.467624        | 9.10532  | 07/08/18 - am | none to low    | 22.8   | 7.56 | 351          |
| 13       | Le Bevinco   | 42.591671        | 9.36287  | 03/08/18 - am | none to low    | 20.7   | 8.21 | 318          |
| 14       | Le Liamone   | 42.168943        | 8.818982 | 13/08/18 - pm | none to medium | 23.6   | 7.89 | 184          |
| 15       | Le Liamone   | 42.078413        | 8.720191 | 15/08/18 - am | none to low    | 23.3   | 7.33 | 4            |
| 16       | Le Liamone   | 42.116121        | 8.817636 | 15/08/18 - am | low to strong  | 21.2   | 7.89 | 50           |
| 17       | Le Porto     | 42.260545        | 8.712663 | 13/08/18 - am | none to medium | 21.9   | 7.92 | 32           |
| 18       | Le Tavignano | 42.209283        | 9.343659 | 01/08/18 - am | low to medium  | 24.7   | 8.14 | 129          |
| 19       | Le Travo     | 41.920442        | 9.346367 | 31/07/18 - am | low to medium  | 23.7   | 7.89 | 30           |
| 20       | Le Vecchio   | 42.224401        | 9.203844 | 06/08/18 - am | low            | 22.1   | 7.74 | 223          |
| 21       | Prunelli     | 41.932864        | 8.914213 | 23/08/18 - am | low to strong  | 17.9   | 7.62 | 109          |
| 22       | Rizzanese    | 41.664014        | 9.013416 | 21/08/18 - am | none to strong | 20     | 7.9  | 39           |
| 23       | Rizzanese    | 41.655436        | 8.982305 | 21/08/18 - am | none to medium | 21.4   | 8.22 | 48           |

The water flow index (m/s) was measured along the prospected transect on the water surface with a floating object, strong ( $\geq 1$  m/s), medium (0.5 m/s), low (0.1 m/s) and none (0 m/s).

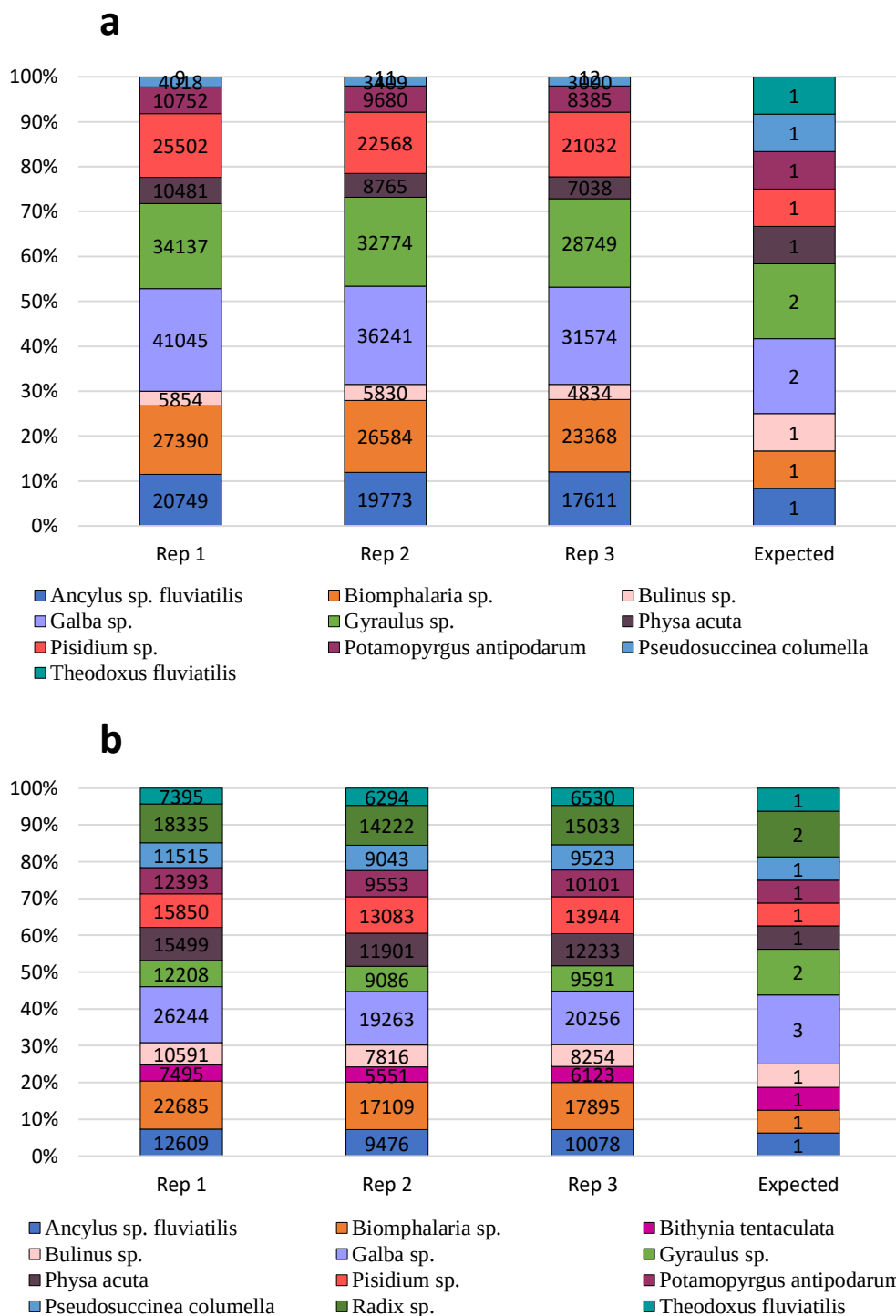
**(Publication 5) Table S2.** Freshwater mollusks that were historically and presently detected in Corsica.

| Species name                    | Habitat               | Identified in sites           | Average headcount per site                  |
|---------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Galba truncatula</i>         | Lotic, Lentic         | 2, 5, 11, 16                  | <b>0.06</b> ( $\pm 0.38$ ) from 0 to 3      |
| <i>Bulinus truncatus</i>        | Lotic, Lentic         | 1, 2, 3, 11                   | <b>2.28</b> ( $\pm 13.95$ ) from 0 to >100  |
| <i>Bithynia tentaculata</i>     | Lotic, Lentic         | 13                            | <b>0.02</b> ( $\pm 0.28$ ) from 0 to 3      |
| <i>Ancylus fluviatilis</i>      | Lotic                 | All except 16                 | <b>26.68</b> ( $\pm 40.53$ ) from 0 to >100 |
| <i>Potamopyrgus antipodarum</i> | Lotic, Lentic         | All except 4 and 12           | <b>48.03</b> ( $\pm 46.38$ ) from 0 to >100 |
| <i>Physa acuta</i>              | Lentic, Lotic         | 3, 6, 7, 8, 9, 15, 16, 21, 23 | <b>17.38</b> ( $\pm 34.29$ ) from 0 to >100 |
| <i>Pisidium casertanum</i>      | Lotic, ditches, ponds | 8, 11, 15, 21, 22, 23         | <b>1.45</b> ( $\pm 7.10$ ) from 0 to 50     |
| <i>Gyraulus laevis</i>          | Lentic, lotic         | 20, 23                        | <b>0.06</b> ( $\pm 0.34$ ) from 0 to 3      |
| <i>Gyraulus</i> sp.             | Lentic, lotic         | 6, 7, 12, 14, 15, 17, 20, 23  | <b>2.99</b> ( $\pm 8.66$ ) from 0 to 50     |
| <i>Radix balthica</i>           | Lentic, Lotic         | 1, 2                          | <b>0.11</b> ( $\pm 1.21$ ) from 0 to 13     |
| <i>Theodoxus fluviatilis</i>    | Lotic                 | 23                            | <b>0.87</b> ( $\pm 5.26$ ) from 0 to 50     |
| <i>Stagnicola palustris</i>     | Ponds                 | –                             |                                             |
| <i>Planorbis planorbis</i>      | Ponds, lentic         | –                             |                                             |
| <i>Moitessieria corsica</i>     | Groundwater           | –                             |                                             |
| <i>Sphaerium lacustre</i>       | Lentic                | –                             |                                             |
| <i>Unio mancus</i>              | Lotic                 | –                             |                                             |
| <i>Acroloxus lacustris</i>      | Lentic                | –                             |                                             |
| <i>Hippeutis complanatus</i>    | Ponds, ditches        | –                             |                                             |

These data are recovered from the work of Mouthon, 1982 and confirmed with the INPN

2020 database. Lentic = still water, Lotic = flowing water. The displayed median headcount for each species reported by the malacological survey consider the six measure units conducted on each sites as separate values.





**(Publication 5) Figure S3.** Number of sequences generated per species in equimolar controls, **a.** results for pooled DNA (N = 12) and **b.** results for pooled PCR products (N = 16). The first three columns are associated to the three technical replicate realized for each pool category, the fourth column give the expected composition of the sample in number of distinct DNA ordered per genus.

## 2. Caractérisation des communautés de trématodes en milieux d'eau douce par metabarcoding environnemental

Être capable de caractériser les communautés de trématodes au sein de leurs hôtes intermédiaires ou dans l'environnement pour les formes libres des parasites, constituerait une avancée majeure dans l'amélioration des stratégies de lutttes contre les maladies transmises par les mollusques d'eau douce dans le monde (Aivelo & Medlar, 2018). Cela permettrait d'éviter la transmission de ces parasites à l'Homme ou aux animaux d'élevage en identifiant directement les foyers de transmission et sites à risque de transmission et donc en limitant l'accès à ces derniers, des stratégies d'évitement déjà employées pour limiter la transmission de la fasciolose aux bovins d'élevages qui consiste en de la gestion des zones de pâturage (Knubben-Schweizer et al., 2010; Selemetas, Phelan, O'Kiely, & de Waal, 2015). Comme nous avons pu le voir avec les mollusques, la connaissance de la composition des communautés de trématodes dans l'environnement et notamment des interactions biotiques entre ces organismes peuvent s'avérer utile pour identifier des sites présentant une communauté de trématodes peu favorables à l'établissement d'une espèce d'intérêt médical ou vétérinaire.

Tout comme les espèces de mollusques interagissent entre elles dans l'environnement (Amarista et al., 2001), plusieurs espèces de trématodes peuvent co-infecter une même espèce de mollusque (Laidemitt et al., 2019). Pour illustrer ce propos, une étude sur la biodiversité de trématodes menée par Laidemitt et al., 2019 dans l'ouest du Kenya a pu identifier localement 26 espèces distinctes de trématodes infectant seulement deux espèces de mollusques d'eau douce qu'elles partagent, *i.e.* *B. pfeifferi* et *Biomphalaria sudanica*, (Laidemitt et al., 2019). Avec une telle diversité de parasites au sein d'un même hôte il est fort probable que ces espèces de trématodes interagissent entre elles et que certaines de ces interactions soient délétères pour les espèces en cohabitation (Laidemitt et al., 2019). Cette même étude l'a d'ailleurs démontré avec *Calicophoron sukari*, un trématode infectant le bétail qui partage le même hôte mollusque que *S. mansoni*, *B. glabrata*. Lorsque ces trématodes coinfectent, *C. sukari* limite significativement le développement de *S. mansoni* au sein de l'hôte partagé, cette compétition intramolluscale a même des répercussions sur la dynamique locale de bilharziose intestinale humaine (Laidemitt et al., 2019). Des études similaires ont identifié de tels phénomènes de compétitions interspécifiques entre *S. mansoni* et *Echinostoma caproni*, un trématode intestinal de rongeurs (Toledo et al., 2006), lorsque ces

deux espèces coinfectent *B. glabrata*, les rédies de *E. caproni* (i.e. un stade larvaire intramolluscal de trématodes qui produit des cercaires par bourgeonnement interne) peuvent avoir un comportement de prédation des sporocystes de *S. mansoni* et ainsi freiner le développement intramolluscal de ce dernier (Basch & DiConza, 1975). Il a été également démontré que cette compétition interspécifique pouvait influencer sur les traits d'histoire de vie de l'hôte mollusque, *B. glabrata*, notamment la fécondité, et induire de fortes mortalités chez l'hôte du fait de l'accélération du développement des deux parasites (Sandland et al., 2007). Ces résultats confirment que nous avons une vision limitée de ces systèmes et appuient la nécessité de mieux caractériser ces communautés de trématodes afin de mieux comprendre les phénomènes qui les régissent.

À l'heure actuelle les méthodes permettant d'acquérir des données sur la distribution spatiale des trématodes sont essentiellement basées sur des données épidémiologiques issues de patients ou d'animaux infectés (Keiser & Utzinger, 2009; Kincaid-Smith et al., 2017; Beesley et al., 2018). Ce sont des données obtenues par la dissection d'hôtes définitifs ou de la détection d'œufs de parasites dans les urines ou fèces de ces derniers (Pontes et al., 2003; Brockwell et al., 2013) ou encore de la sérologie (Espinoza et al., 2007). Il est en effet bien plus facile d'identifier l'espèce d'un trématode à partir de sa forme adulte qu'à partir d'une forme libre ou d'œufs, qui présentent plus d'homologies morphologiques avec d'autres espèces (Gasser, 2006). En ce qui concerne la détection intramolluscale de trématodes, nous avons déjà évoqué les limitations rencontrées en ce qui concerne les approches basées sur l'émission de cercaires ou sur la dissection de tissus de mollusques, le temps que ces méthodes requièrent (Born-Torrijos et al., 2014), ainsi que la quantité de mollusques qu'il est nécessaire d'échantillonner en raison des faibles prévalences dans les populations de mollusques rencontrées pour certains modèles (Eppert et al., 2002; Ramalli et al., 2018). De même, les approches basées sur la cercariométrie (Theron, 1979b) sont dépendantes de la chronobiologie des espèces de trématodes étudiées (Theron, 2015). Ces approches peuvent donner des faux négatifs si les périodes de prélèvements ne coïncident pas avec les heures d'émission de cercaires, ce qui sous-entend de devoir faire des mesures en continu pour pallier ce risque. De plus, la cercariométrie nécessite des connaissances étendues sur l'identification d'espèces de trématodes à partir de cercaires (Theron, 1979b, 1986, 2015) et les connaissances en chronobiologie pour les espèces autres que les schistosomes sont rares.

Les outils moléculaires intramolluscaux (*e.g.* RD-PCR et TAS) sont quant à eux également limités par la quantité et la diversité de mollusques échantillonnés (Ramalli et al., 2018), en fonction des espèces de mollusques diagnostiquées la diversité de trématodes qu'il sera possible de détecter par ces méthodes peut être limitée par le spectre d'hôtes des parasites (Kincaid-Smith et al., 2017). De plus, ces outils sont généralement dédiés à la détection d'un nombre limité d'espèces (Hammoud et al., in prep). Comme évoqué précédemment, les espèces étudiées sont principalement celles ayant un fort impact en santé humaine et animale, notamment la bilharziose et la fasciolose. De fait, la communauté de trématodes caractérisable par ces divers moyens ne reflète pas entièrement la diversité de trématodes qui peut être retrouvée directement en milieu naturel, ce qui limite la compréhension de l'assemblage de ces communautés et donc la compréhension des interactions qui les régissent (Kincaid-Smith et al., 2017).

Dans ce contexte, le metabarcoding environnemental constitue une approche d'intérêt pour faire un suivi des communautés de trématodes que ce soit dans leurs hôtes tout comme dans l'environnement (Bohmann et al., 2014; Bass et al., 2015). Ce type d'approche résulterait en une caractérisation plus rapide et précise des communautés de trématodes (Bik et al., 2012) tout en évitant l'élimination de mollusques et d'animaux domestiques (Aivelo & Medlar, 2018). Par ailleurs des outils de metabarcoding à partir d'ADNe ont déjà fait leurs preuves dans la détection de microorganismes, par exemple pour la caractérisation des communautés d'organismes présents dans l'eau de ballast, afin de prévenir de l'introduction d'espèces exotiques (Rey et al., 2019), pour la caractérisation de communautés d'helminthes d'animaux sauvages à partir d'échantillons de fèces ou d'urine (Aivelo & Medlar, 2018), et pour la caractérisation de communautés de nématodes vivant dans les sols à partir d'échantillons de sédiments (Ahmed et al., 2019). En parasitologie, le metabarcoding environnemental s'est révélé fonctionnel pour la détection d'organismes pathogènes dans des eaux et sols contaminés, notamment pour la détection de bactéries du genre *Leptospira* et du microbiome pathogène environnant (Sato et al., 2019). Ces bactéries gram négatifs sont responsables de la leptospirose chez l'Homme, elles peuvent persister dans des sols et eaux contaminées par l'urine ou les fèces d'hôtes réservoirs constituant ainsi un risque infectieux pour l'Homme (Sato et al., 2019). En aquaculture des outils similaires ont été développés pour la détection de pathogènes du saumon notamment *Lepeophtheirus salmonis* et *Paramoeba*



*perurans* à partir de prélèvements d'eau de mer (Peters et al., 2018). Et dans un tout autre registre, le metabarcoding environnemental a déjà été employé pour le suivi de pathogènes de plantes à partir d'ADNe contenu dans les granules de pollen retrouvé dans les ruches d'abeilles (Tremblay et al., 2019). Pour l'heure aucun outil similaire permettant de caractériser les communautés de trématodes au sens large n'existe, seuls les outils ADNe cités dans le chapitre précédent ont été développés, mais ces derniers sont spécifiques à une espèce ou ciblent une diversité très limitée (Hashizume et al., 2017; Jones et al., 2018; Alzaylaee, Collins, Rinaldi, et al., 2020). C'est pourquoi nous nous sommes proposés de compléter cette lacune en développant un outil de metabarcoding environnemental pour caractériser les communautés de trématodes entières à partir d'échantillons environnementaux.

#### **a. Recherche d'un marqueur spécifique à la classe des trématodes**

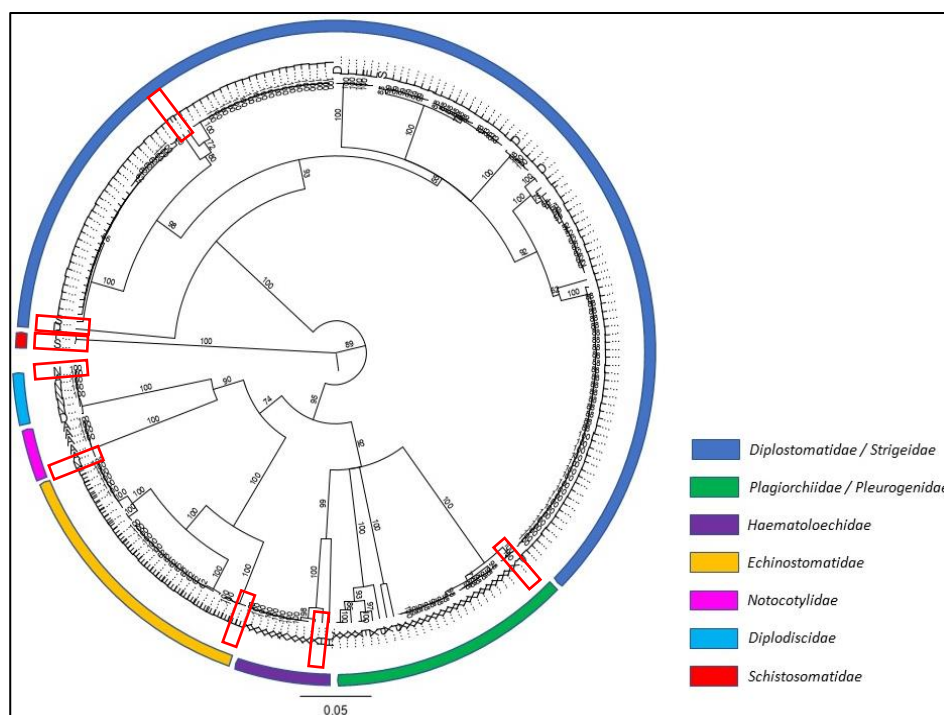
Ce travail a été effectué dans le cadre du stage de master 2 de Philippe Douchet que j'ai eu l'occasion de co-encadrer en 2020 pendant plus de 5 mois. La première étape de ce travail a consisté à développer un marqueur moléculaire spécifique à la classe des trématodes. En partant de nos acquis avec le développement de l'outil de metabarcoding environnemental pour les mollusques, nous avons choisi d'orienter notre recherche de marqueur sur le génome mitochondrial pour les raisons précédemment évoquées (*i.e.* un génome ayant une conformation circulaire lui conférant une meilleure résistance dans l'environnement qu'une molécule d'ADN linéaire, et qui est présent en plusieurs copies au sein d'une même cellule ; Taberlet et al., 2018). En ce qui concerne le protocole de création des amorces, nous avons utilisé le logiciel OBITools (Boyer et al., 2016; Taberlet et al., 2018) permettant de valider la spécificité des amorces sur des communautés fictives de séquences d'ADN définies par l'utilisateur. Plus précisément, nous avons utilisé l'utilitaire ecoPrimers qui fait partie d'OBITools pour la génération des amorces (Riaz et al., 2011). Afin d'avoir plus de possibilités dans la création des amorces, nous avons généré ces dernières à partir d'une matrice de séquences contenant 248 génomes mitochondriaux complets de trématodes, représentant 51 espèces distinctes réparties en 19 familles, un jeu de données publiques récupérables sur GenBank (Clark, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell, & Sayers, 2016) qui est représentatif de la diversité de la classe des trématodes (Olson, Cribb, Tkach, Bray, & Littlewood, 2003). Les amorces ont été générées pour respecter un ensemble de critères permettant une compatibilité avec les plateformes de séquençage Illumina MiSeq et maximisant les chances

d'amplifier un fragment d'ADN libre tout en diminuant le risque d'amplification aspécifique (Taberlet et al., 2012; Taberlet et al., 2018).

La spécificité des amorces ainsi générée a ensuite été testée *in silico* par PCR virtuelles en reprenant un protocole de validation en trois étapes, similaire à celui utilisé pour la création des amorces qPCR spécifiques à *B. truncatus* présenté dans le second chapitre, voir la section **Chapitre II.1.a**. Pour ce faire nous avons utilisé l'utilitaire ecoPCR d'OBITools (Taberlet et al., 2018), un utilitaire homologue à ecoPrimers dédié à la simulation de PCR à partir d'un fichier contenant des paires d'amorces, les paramètres à tester et d'un jeu de données requête définie par l'utilisateur (Ficetola et al., 2010). La première série de PCR virtuelles a été réalisée sur le jeu de donnée de 248 génomes mitochondriaux de trématodes utilisé pour la création des amorces, afin de s'assurer que ces dernières amplifient la plus grande diversité de trématodes possibles. La seconde série de PCR virtuelles a été réalisée sur un jeu de données non restreint aux trématodes contenant 5676 génomes mitochondriaux, soit 5624 espèces réparties sur 26 phyla distincts, des séquences récupérées sur le serveur FTP de GenBank le 27/01/2020 (NCBI, 2020). Cette seconde étape permet de vérifier que les amorces amplifient préférentiellement des séquences mitochondriales de trématodes même en présence de génomes mitochondriaux d'autres organismes. Enfin, une dernière étape de vérification non restreinte aux génomes mitochondriaux a été réalisée par « Basic Local Alignment Search Tool » (BLAST) à l'aide de l'utilitaire PrimerBLAST du NCBI (Ye et al., 2012) sur la base de données Ref-seq non redondante (*i.e.* ~ 217 millions de séquences tous marqueurs confondus et toute espèce confondue). Enfin les paires d'amorces résultantes ont été modifiées manuellement pour améliorer leur stabilité lors de l'amplification d'ADN en ajustant les températures d'hybridation à 60°C ainsi que le degré de dégénération des amorces. Ces ajustements permettent de limiter la formation de structures secondaires des amorces entre elles et avec elles-mêmes (*e.g.* tête d'épingle et homo ou hétérodimères), ils diminuent également les chances d'amplifications aspécifiques qui peuvent subvenir quand des températures d'hybridation peu restrictives sont utilisées. La recherche de structure secondaire a été effectuée par l'intermédiaire des utilitaires IDTDNA's Oligo Analyzer (IDT-DNA, 2020) et Primer3plustools (Untergasser, 2020).

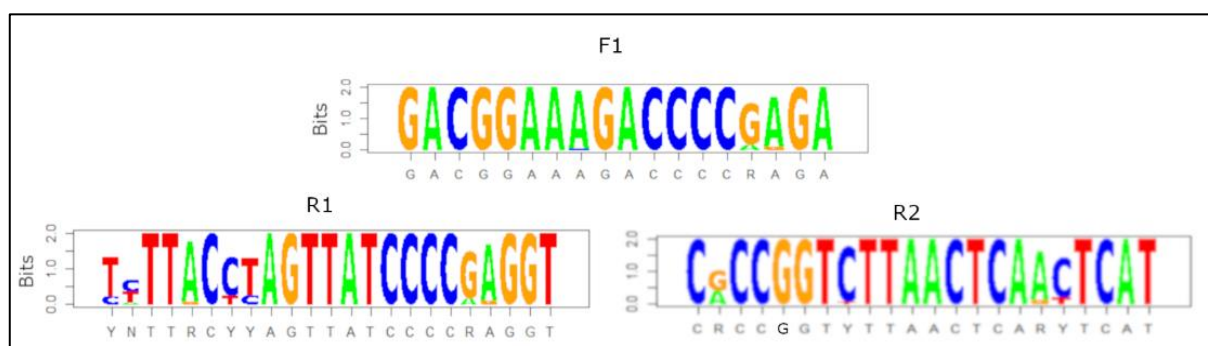
Enfin nous avons évalué *in vitro* la capacité de ces amorces à détecter une large diversité d'espèces de trématodes et à les différencier, pour ce faire nous avons réalisé des

PCR en point final sur des ADN extraits de trématodes provenant d'une collection d'ADN que nous rassemblons dans le cadre de ce projet, et qui proviennent de notre laboratoire ou ont été fournis par des collaborateurs extérieurs notamment Hubert Ferté de l'Université de Reims et Sylvie Hurtrez-Boussès de l'IRD de Montpellier, qui nous ont fourni une impressionnante collection d'ADN et d'échantillons de trématodes. Cette collection consiste en un ensemble d'échantillons d'ADN extraits à partir de trématodes adultes ou de cercaires dont les morphotypes ont été visuellement déterminés, mais pas déterminés au niveau de l'espèce. Elle est composée d'un total de 37 espèces réparties en 11 familles, **Figure 17**. Pour 226 de ces échantillons, nous disposons également de séquences du gène nucléaire 28S. Un sous-ensemble représentatif de la diversité de ces échantillons a été sélectionné à partir d'une phylogénie construite sur les séquences de 28S, **Figure 17**. Ces échantillons représentatifs de la collection ont ensuite été utilisés pour la validation *in vitro* des amorces généralistes de trématodes.



**Figure 17.** Arbre consensus construit à partir de l'alignement des 226 séquences de 28S provenant de la collection d'ADN de trématodes, généré sur Geneious par clustering UPGMA. Les échantillons encadrés en rouge ont été sélectionnés pour les étapes de validation *in vitro* des amorces généralistes de trématodes. Aux échantillons sélectionnés s'ajoutent les échantillons fournis par S. Hurtrez-Boussès et ceux récupérés à l'IHPE soit *Fasciola gigantica*, *Calicophoron daubneyi*, *Schistosoma mansoni* et *Schistosoma haematobium*.

À l'issue de ce travail nous avons généré deux paires d'amorces chevauchantes utilisant la même amorce sens, des marqueurs spécifiques aux trématodes localisés à la fin du gène mitochondrial 16S qui permettent l'amplification de deux amplicons : l'un d'environ 80 pb et l'autre d'environ 220 pb respectivement, **Figure 18**. Selon les résultats de la première phase de vérification de spécificité par PCR virtuelle (*i.e.* test des amorces contre le jeu de données utilisé pour leur création) réalisée sur 51 génomes mitochondriaux de trématodes, ces amorces permettent d'amplifier la totalité des 51 génomes testés, les sites d'hybridation entre l'amorce et la séquence d'ADN sont quant à eux relativement bien conservés avec très peu de polymorphisme au niveau de la séquence nucléotidique notamment pour l'amorce sens commune, **Figure 18**.

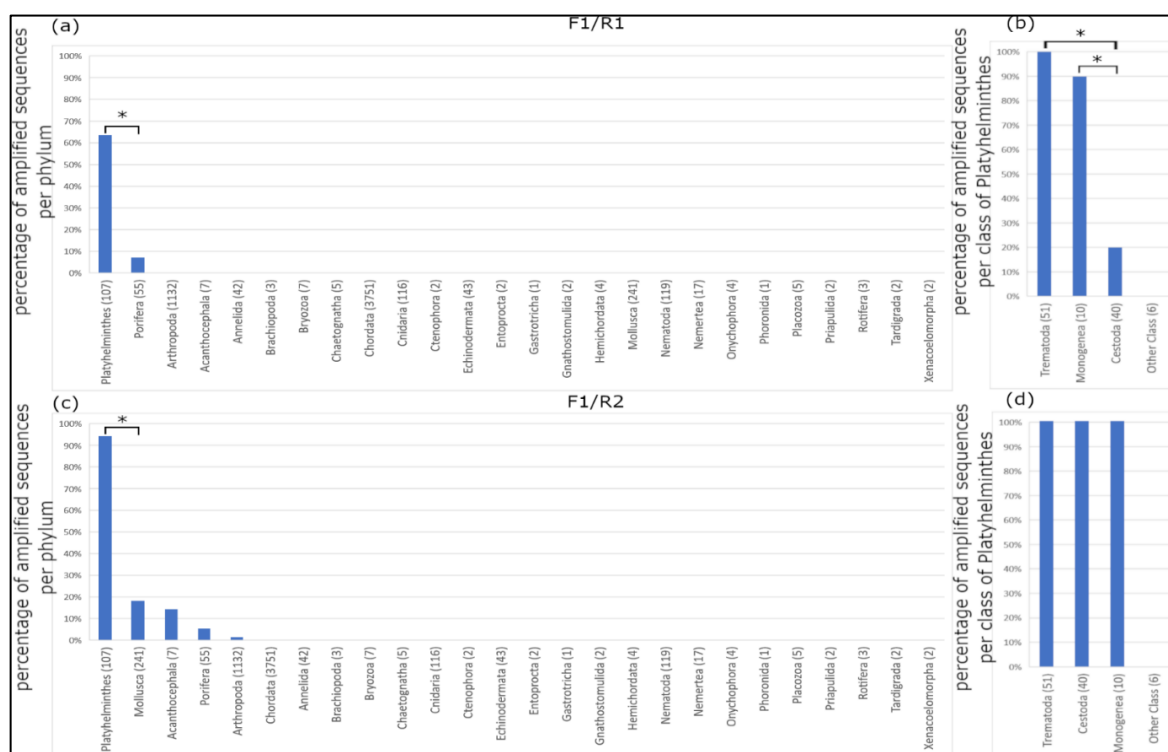


**Figure 18. Représentation des séquences d'hybridation des amorces de trématodes ou "sequence logo".** La taille des bases nucléotidiques représentées dépend de la fréquence d'apparition de la base nucléotidique dans toutes les séquences du jeu de données, une valeur exprimée en bits (ou nombre d'occurrences sur le total de séquences). Ainsi, plus une base nucléotidique est grande sur la représentation graphique, plus cette dernière apparaît souvent dans le jeu de données. L'amorce sens F1 est commune aux deux amorces anti-sens R1 et R2.

Les résultats de la seconde phase de vérification de spécificité par PCR virtuelle (*i.e.* réalisée sur les 5676 génomes mitochondriaux toutes espèces confondues), ont permis de déterminer que les amorces candidates F1/R1 amplifient 63,7% des séquences de plathelminthes présentes dans le jeu de données, 7,3% de séquences de porifères et 0,4% de séquences d'Arthropodes, **Figure 19a**. Parmi les séquences de plathelminthes, la totalité des 51 génomes de trématodes sont correctement amplifiés, ainsi que 20% des génomes mitochondriaux de cestodes et 90% des génomes de monogènes, **Figure 19b**. Les tests exacts de Fisher réalisés sur ces données démontrent que les séquences de plathelminthes sont enrichies de manière significative par rapport aux séquences de porifères ( $P < 0,0001$ ). Parmi

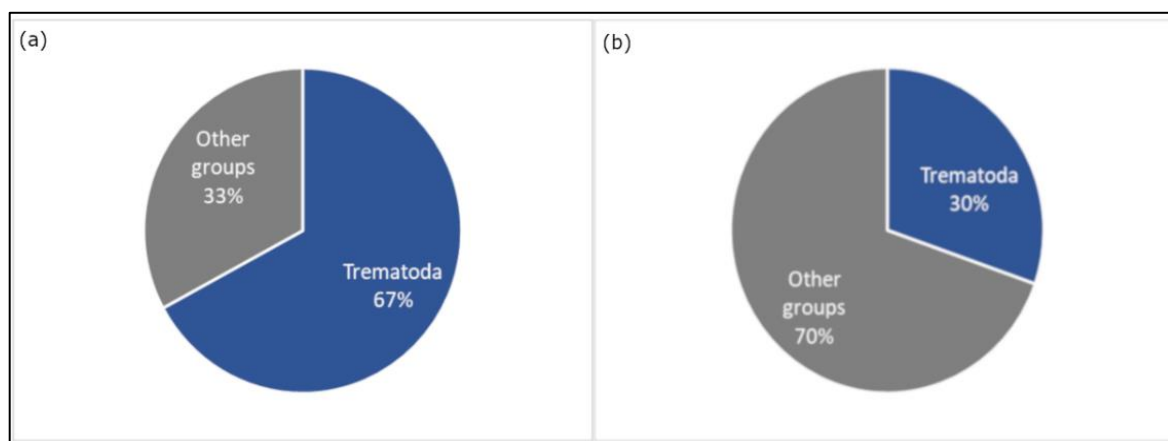


ces séquences, les trématodes ( $P < 0,0001$ ) et les monogènes ( $P < 0,0001$ ) sont significativement enrichis par rapport aux cestodes. Les analyses réalisées sur les amorces F1/R2 résultent en l'amplification de 94,4% des séquences de plathelminthes présentes dans le jeu de données, ainsi que 18,3% des séquences de mollusques, 14,3% des séquences d'acanthocéphales, 5,5% des séquences de porifères et 1,5% des séquences d'arthropodes, **Figure 19c**. Parmi les séquences de plathelminthes, une fois encore la totalité des 51 génomes de trématodes est amplifiée ainsi que la totalité des génomes mitochondriaux de cestodes et de monogènes, **Figure 19d**. Les tests exacts de Fisher confirment que les génomes de plathelminthes ( $P < 0,0001$ ) sont préférentiellement amplifiés en comparaison des génomes de mollusques. La comparaison de ces résultats entre les deux paires d'amorces démontre cependant que parmi les séquences de plathelminthes, F1/R2 amplifie préférentiellement les cestodes par rapport au amorces F1/R1 ( $P < 0,0001$ ). En dehors de ces séquences, F1/R2 amplifie plus facilement des séquences de mollusques ( $P < 0,0001$ ) et d'arthropodes ( $P = 0,007$ ) que F1/R1.



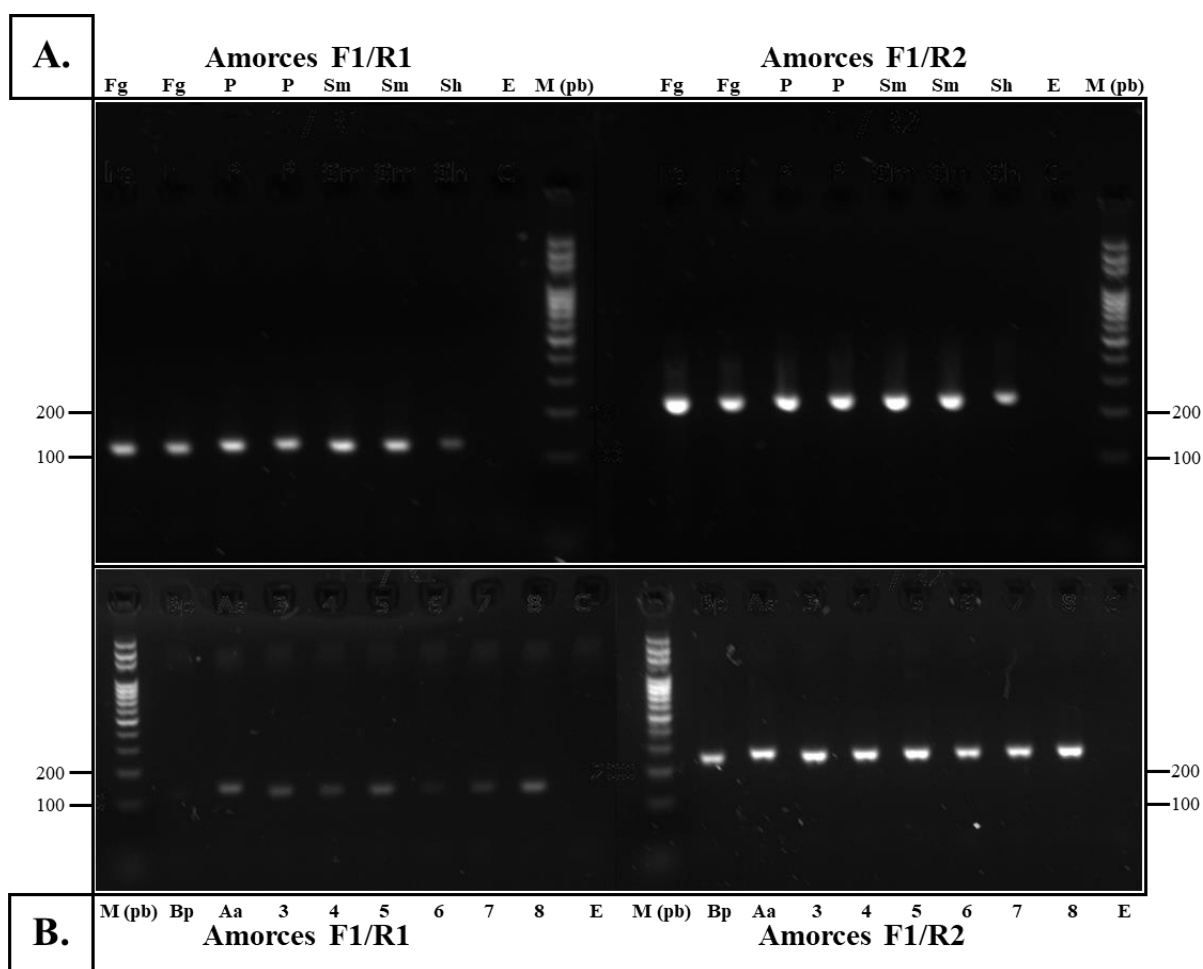
**Figure 19. Pourcentage de séquences amplifiées par les couples d'amorces F1/R1 et F1/R2, triées par phylum (a, c) et pas classes de Platyhelminthes (b, d). Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de séquences présentes dans la base de données. \* : Seuil de significativité d'un test exact de Fisher à p-value < 0,001.**

De fait, la paire d'amorces F1/R2 apparaît moins spécifique en termes d'enrichissement préférentiel de séquences de trématodes que la paire d'amorces F1/R1. Avec les séquences de trématodes qui représentent 30% du total des séquences amplifiées par F1/R2 (**Figure 20b**) contre 67% du total de séquences amplifiées pour F1/R1 (**Figure 20a**).



**Figure 20. Comparaison du pourcentage de séquences de trématodes amplifiées par rapport aux autres groupes taxonomiques représentés dans la base de données. Résultats pour le couple d'amorces F1/R1 (a) et pour le couple d'amorces F1/R2 (b).**

En ce qui concerne l'étape de validation *in vitro* des amorces, les résultats des tests PCR en point final sont très encourageants, sur 12 ADN d'espèces distinctes de trématodes réparties sur 9 familles seulement une seule espèce n'a pas été détectée (*i.e. Bilharzia polonica*), dans l'ensemble les amorces ont fonctionné pour au moins un représentant des 9 familles de trématodes représentées dans ce sous-échantillon, **Figure 21b**. L'amplification réalisée par ces deux paires d'amorces résulte en un amplicon d'environ 120 pb pour F1/R1 (*i.e.* amplicon de 80 pb + 40 pb d'amorces) et d'environ 260 pb pour F1/R2 (*i.e.* amplicon de 220pb + 40 pb d'amorces), les produits d'amplifications sont tous de taille homogène (*i.e.* des bandes uniques et bien distinctes), **Figure 21**. Ces résultats rassurent quant à la qualité de l'hybridation des amorces avec les séquences cibles et sur la spécificité génomique de ces marqueurs (*i.e.* pas d'amplification visible avec une séquence non ciblée en PCR point final). Cependant ces résultats doivent encore être confirmés par le séquençage de mélanges d'échantillons d'ADN « pool équimolaire » comme nous l'avons fait pour valider l'outil de metabarcoding environnemental pour les mollusques.



**Figure 21. Produits PCR générés par les amorces de trématodes F1/R1 et F1/R2 sur :** A. Fg, *Fasciola gigantica* (Fasciolidae) ; P, *Paramphistomidae* ; Sm, *Schistosoma mansoni* ; Sh, *Schistosoma haematobium* (Schistosomatidae). Les doublons correspondent à des répliqua techniques. B. Bp, *Bilharzia polonica* (Schistosomatidae) ; Aa, *Alaria alata* (Diplostomatidae) ; 3, *Diplostomatidae* sp. ; 4, *Plagiorchiidae* sp. ; 5, *Echinostomatidae* sp. ; 6, *Notocotylidae* sp. ; 7, *Diplodiscidae* sp. ; 8, *Haematoloechidae* sp. Notations générales : E, contrôle négatif eau ; M (pb), marqueur de taille 100 paires de bases.

### b. Développements futurs

*In fine*, nous disposons de deux marqueurs moléculaires permettant d'amplifier, virtuellement l'ADN mitochondrial d'une grande diversité de trématodes même en présence d'une grande diversité de séquences non-trématodes. Cela dit, beaucoup reste à faire en ce qui concerne cet outil qui ne pourra pas être finalisé dans le cadre de ma thèse. Philippe Douchet reprendra ces travaux à l'occasion de son projet de thèse visant à étudier l'effet des gradients environnementaux et de la fragmentation des habitats sur la structuration des communautés de trématodes. La première étape de ce projet de thèse visera à terminer les validations *in vitro* et *in natura* de l'outil de metabarcoding environnemental pour les trématodes, soit de réaliser une série de tests similaires à ceux effectués pour l'outil de metabarcoding environnemental pour les mollusques (*i.e.* validation sur des pool équimolaires d'ADN de trématodes, puis validation *in natura* par des approches comparatives). Cependant, comme il est impossible de confirmer visuellement la présence de microorganismes tels que les trématodes par observation directe *in natura*, la validation de cet outil de metabarcoding environnemental par des approches comparatives devra être adaptée à ce type de modèle. Pour ce faire plusieurs pistes seront exploitées, notamment l'utilisation des outils présentés au début de cette section de chapitre et en introduction comme les techniques d'émission de cercaires à partir de mollusques échantillonnés directement sur le terrain (Born-Torrijos et al., 2014; Boissier et al., 2016) ou encore par de la cercariométrie (Theron, 1986). De plus cet outil fera l'objet d'une validation en mésocosme approfondie par des approches similaires à celles employées dans le cadre des tests en mésocosme réalisés sur les amorces qPCR spécifiques à *B. truncatus*, confère section **Chapitre II.1.a**. Notamment, des cinétiques de contact/persistance similaires à celles effectuées dans le cadre du stage d'Anaïs Loisier sur *B. truncatus* seront réalisées. Enfin, tout comme l'outil de metabarcoding environnemental pour les mollusques il sera nécessaire de valider cet outil sur une grande diversité d'environnements naturels afin de disposer d'outils de suivis environnementaux opérationnels pour rapidement caractériser les communautés de mollusques et de trématodes à large échelle. Nous serons donc plus à même de comprendre l'assemblage de ces communautés et donc d'ouvrir la voie à des études pour caractériser les interactions biotiques en leur sein afin de les utiliser pour limiter le développement de trématodes d'intérêt médical et vétérinaire dans le monde.



## Perspectives en termes de stratégies de lutte

---

### Remise en contexte

L'accélération des changements globaux qu'ils soient d'origine climatique ou anthropique a de multiples conséquences sur la totalité des écosystèmes terrestres et aquatiques (Parmesan & Yohe, 2003; Camill, 2010; Waldron et al., 2017), mais aussi en santé humaine et animale (Rahmstorf & Coumou, 2011; Kim et al., 2014; Pandey et al., 2014). L'une des plus importantes est la modification des aires de distribution géographique des espèces et donc de celle des pathogènes associés à tous ces organismes (Ogden et al., 2019). Dans ce contexte, nous vivons actuellement une recrudescence des cas d'émergences et de réémergences de maladies infectieuses dans le monde (Jones et al., 2008; Zuckerman et al., 2014; Destoumieux-Garzon et al., 2018). Alors que les efforts de recherche menés dans ce domaine se concentrent principalement sur les maladies virales (Bausch & Schwarz, 2014; Chatterjee et al., 2020) et sur les maladies transmises par les arthropodes (Institute Of Medicine, 2008; WHO, 2017b), les maladies transmises par les mollusques d'eau douce reçoivent moins d'intérêt alors qu'elles atteignent plus d'un milliard d'individus dans le monde (Kincaid-Smith et al., 2017; Kincaid Smith, 2018; Sabourin et al., 2018; Boissier et al., 2019). Les connaissances sur la dynamique des pathogènes associés à ces maladies reposent principalement sur des données épidémiologiques issues de diagnostics médicaux ou vétérinaires (Kincaid-Smith et al., 2017; Ajibola et al., 2018; Beesley et al., 2018). Ces approches ne permettent pas de prévenir de la transmission de ces parasites à l'Homme ou aux élevages ou d'anticiper les émergences de ces maladies. Dans le cadre d'une approche « One-Health » appliquée à l'étude des maladies transmises par les mollusques d'eau douce, le suivi de la dynamique de ces pathogènes dans l'environnement et dans leurs hôtes intermédiaires mollusques devient nécessaire (Kincaid-Smith et al., 2017; Ramalli et al., 2018; Ogden et al., 2019; WHO, 2020). Cependant, les outils conventionnels pour se faire sont difficilement applicables pour une prospection à large échelle (Lu et al., 2018) et peuvent nécessiter une importante main d'œuvre (Holmes et al., 2018).

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes proposés d'apporter des connaissances sur ces évènements d'émergences de maladies transmises par les mollusques d'eau douce. Avec l'exemple de l'émergence récente de bilharziose urogénitale en Corse, nous avons étudié

cette émergence en tenant compte : (i) des traits d'histoire de vie des organismes impliqués dans le cycle parasitaire, notamment la thermotolérance du parasite *S. haematobium* et de l'hôte mollusque *B. truncatus* (Mulero et al., 2019) ; et (ii) du rôle des hôtes définitifs sauvages et domestiques dans la persistance de ce cycle parasitaire (Oleaga et al., 2019). Ces deux études ont permis de démontrer que la progression de la bilharziose urogénitale dans l'hémisphère Nord semble essentiellement dépendre de la présence d'hôtes mollusques compatibles et adaptés au climat de leur latitudes respectives (Mulero et al., 2019) et des flux de populations humaines en provenance des zones d'endémie pour l'introduction du parasite (Kalinda et al., 2017; Kincaid Smith, 2018; Panagiotopoulos, 2018).

À la vue de ces résultats et de leur importance dans cet événement d'émergence, le suivi environnemental de ces parasites et de leurs hôtes mollusques prend tout son sens dans une perspective de contrôle (Kincaid-Smith et al., 2017; Kincaid Smith, 2018). C'est pourquoi nous avons développé une série d'outils de diagnostic ciblés pour collecter des données sur la distribution spatiale du parasite *S. haematobium* par un diagnostic PCR intramolluscal, afin d'identifier les foyers de transmission de ce parasite (Ramalli et al., 2018). Nous avons fait de même pour l'hôte mollusque *B. truncatus* dont nous détectons l'ADNe à partir d'eau filtrée ; cette approche permet quant à elle d'identifier les sites à risque d'émergence du parasite (Mulero, Boissier, et al., 2020). J'ai également participé au développement d'outils moléculaires similaires permettant l'identification intramolluscale simultanée de plusieurs espèces de trématodes et de leurs hôtes mollusques par RD-PCR et par séquençage d'amplicons ciblés (TAS) (Schols et al., 2019 ; Hammoud et al., in prep), ces outils sont utiles pour identifier les foyers de transmission et les sites à risque de transmission tout en permettant de quantifier les interactions biotiques entre les espèces de trématodes qui co-infectent un même mollusque.

Enfin, nous avons développé un outil de metabarcoding environnemental plus généraliste dédié à la caractérisation des communautés de mollusques d'eau douce et initié le développement d'un outil similaire pour caractériser les communautés de trématodes à partir d'eau filtrée. Les connaissances sur l'assemblage de ces communautés permettront, à terme, d'alimenter des stratégies de lutte biologique à l'encontre de trématodes de l'Homme et/ou de l'animal (Mulero, Toulza, et al., 2020). Ensemble, ces deux approches ADNe généralistes constituent un outil particulièrement efficace pour détecter à la fois les foyers de

transmission actifs et les sites à risque d'émergence pour plusieurs maladies transmises par les mollusques d'eau douce. Ces outils sont également plus facile à mettre en œuvre pour des suivis spatio-temporels à large échelle (Mulero, Toulza, et al., 2020).

### **L'ADN environnemental pour le suivi des maladies transmises par les mollusques d'eau douce et de la biodiversité**

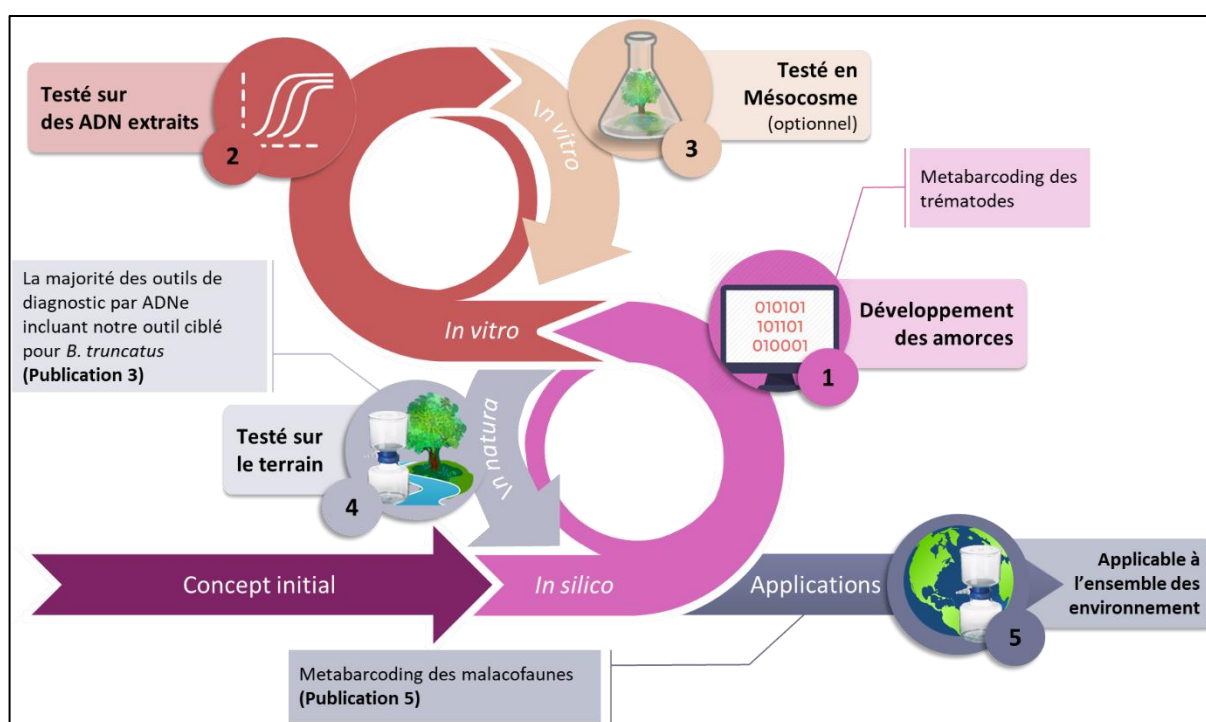
D'après les résultats de ma thèse et ceux d'autres études basées sur l'ADNe dans la littérature, l'ADNe constitue une approche d'intérêt pour le suivi de maladies infectieuses transmises par les mollusques d'eau douce (Jones et al., 2018; Alzaylaee, Collins, Rinaldi, et al., 2020; Mulero, Boissier, et al., 2020; Mulero, Toulza, et al., 2020) mais aussi pour le suivi de l'ensemble des maladies infectieuses (Bass et al., 2015) et plus généralement pour le suivi de la biodiversité (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2018; Adams et al., 2019). Le principal avantage de ce type d'approche réside en la simplicité à échantillonner l'eau et/ou les sédiments (Taberlet et al., 2018) par comparaison avec des techniques de prospection classique qui nécessitent d'échantillonner et d'identifier les individus un par un. Le second avantage de ces approches est la détection indirecte des organismes (*i.e.* sans avoir à les isoler au préalable) (Taberlet et al., 2018) qui est particulièrement utile pour détecter les espèces rares et/ou cryptiques (Holmes et al., 2018; Prié et al., 2020). Cette détection indirecte dépend évidemment du type de milieux dans lequel s'effectue le prélèvement (*e.g.* les rivières, Deiner et al., 2016), mais s'avère très pratique dans les milieux d'eau douce qui sont généralement difficilement accessibles à l'Homme (Prié et al., 2017) et dans lesquels certaines espèces peuvent être difficiles à prélever manuellement (Mulero, Toulza, et al., 2020; Prié et al., 2020). De fait, des approches par ADNe sont plus susceptibles de permettre la détection précoce d'anomalies telles que l'établissement d'un front d'invasion en cas d'introduction récente d'une espèce invasive (Dejean et al., 2012; Smith, 2017; Taberlet et al., 2018) ou d'un parasite dans le cas d'une émergence. L'identification des espèces par ce type d'approche nécessite cependant des connaissances en biologie moléculaire, en effet, cette étape est dépendante des séquences présentes dans les bases de données publiques (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2018). Il faut également que les amorces utilisées aient été correctement testées et que les protocoles d'échantillonnage et d'extraction aient été correctement développés et appliqués (Thomsen et al., 2012; Rees et al., 2015; Smith, 2017; Mulero, Toulza, et al., 2020).

Enfin, les approches par ADNe ont un impact écologique relativement négligeable dans les environnements prospectés (Valentini et al., 2016) et leur coût tend à rivaliser de plus en plus avec les techniques de prospection visuelle tant le coût d'accès aux technologies de biologie moléculaire et de séquençage diminue avec le temps (Taylor, Laperriere, & Germain, 2017; Taberlet et al., 2018).

Comme pour tous les outils de suivi ou de diagnostic existant, travailler sur l'ADNe présente tout de même quelques inconvénients. L'un des plus notables est la forte hétérogénéité des extraits d'ADN obtenus à partir d'échantillons environnementaux (Taberlet et al., 2018). Les extraits ainsi contenus peuvent en effet être fortement concentrés en ADN faiblement dégradés et avec peu d'inhibiteurs de PCR, ou au contraire, faiblement concentrés en ADN fortement dégradé et chargés en inhibiteur de PCR (Taberlet et al., 2018). De plus, le nombre de prélèvements, la saison de prélèvement (Ficetola, Taberlet, & Coissac, 2016), le type d'environnement dans lequel s'effectuent les prélèvements (Koziol et al., 2018; Mauvisseau et al., 2019; van Bochove et al., 2020), le protocole de conservation et d'extraction de l'ADN (Renshaw, Olds, Jerde, McVeigh, & Lodge, 2015; Balint, Nowak, et al., 2018) et l'étape de création des amorces (Wilcox et al., 2013; Mauvisseau et al., 2019), peuvent influencer la sensibilité des approches par ADNe (Rees et al., 2015; Goldberg et al., 2016; Taberlet et al., 2018). Ces divers éléments convergent vers une autre limitation des approches par ADNe qui est le manque de standardisation des protocoles que nous avons déjà évoqués (Dickie et al., 2018; Mauvisseau et al., 2019; Tsuji et al., 2019), en particulier pour l'étape de conservation et d'extraction de l'ADNe qui est difficilement généralisable compte tenu de l'hétérogénéité des échantillons environnementaux (Taberlet et al., 2018). Cependant, nous avons pu voir que cette limitation commence à être compensée avec l'apparition de consensus dans les protocoles comme par exemple, la filtration d'eau qui est l'approche ayant un meilleur rendement pour l'échantillonnage d'eau (Hinlo et al., 2017; Dickie et al., 2018), ou certains kits d'extractions qui sont plus couramment employés que d'autres dans la littérature (Hinlo et al., 2017). En ce qui concerne l'ADN fortement dégradé, de nouvelles études sur l'ADN ancien proposent des protocoles permettant d'avoir accès aux traces d'ADN anciens et d'en étudier la nature et l'origine (Pedersen et al., 2015; Epp et al., 2019; Nichols, Curd, Heintzman, & Shapiro, 2019).



La seconde limitation des approches par ADNe est le potentiel manque de répliquabilité de ces approches en milieux naturels (Tsuji et al., 2019). Ce biais est lié au manque de standardisation des protocoles évoqué ci-dessus et au fait que ces outils sont généralement développés et testés dans une diversité limitée de milieux naturels (Tsuji et al., 2019). Pour illustrer ce propos avec les milieux d'eau douce, l'utilisation d'un même protocole dans des milieux lotique et lentique peut résulter en des différences en termes de quantité d'ADNe piégée et de volume d'eau filtré avant colmatage des membranes (Tsuji et al., 2019; Mulero, Toulza, et al., 2020). C'est pourquoi, s'assurer du fonctionnement d'un outil de détection par ADNe dans une grande diversité d'environnements différents constitue la dernière étape de développement à atteindre, **Figure 22**.



**Figure 22. Les étapes critiques dans le développement d'un outil de diagnostic par ADN environnemental.** La majorité de ces étapes de développement sont rétrocompatibles en fonction des difficultés techniques rencontrées pendant les phases de développement successives. De fait, un résultat négatif dans une phase avancée de développement peut nécessiter un retour à l'étape antérieure pour des mises au point.

La dernière limitation sur laquelle nous allons revenir est le potentiel manque de précision des approches de metabarcoding environnemental à deux niveaux, d'une part le manque de résolution taxonomique pour la différenciation d'espèces proches (Deiner et al., 2017; Krol et al., 2019) et d'autre part, le manque de précision dans l'estimation de

l'abondance relative des espèces (Deiner et al., 2017; Yates et al., 2020). En ce qui concerne le manque de résolution taxonomique, ce problème est dépendant des séquences présentes dans les bases de données publiques ainsi que de la résolution du marqueur utilisé pour le metabarcoding (*i.e.* capacité du marqueur à différencier un grand nombre d'espèces) (Deiner et al., 2017; Krol et al., 2019). Nous avons éprouvé cette difficulté pendant notre étude de metabarcoding environnemental des malacofaunes de Corse quand il s'agissait de différencier les espèces appartenant au genre *Gyraulus* qui sont difficilement différenciables morphologiquement (Mulero, Toulza, et al., 2020). Plusieurs solutions sont envisageables pour pallier ce problème. La première consiste à renforcer les bases de données par le séquençage systématique de l'ADN des espèces collectées manuellement lors des prospections visuelles pour générer de nouveaux marqueurs (Balint, Pfenninger, et al., 2018). La seconde solution consiste à utiliser un ensemble de sondes qui se complètent en termes de résolution taxonomique (Krol et al., 2019), une approche que nous préconisons pour la détection des *Thiaridae* pour la caractérisation des malacofaunes de Guadeloupe (données en cours d'analyses) et qui est recommandée dans les récentes études de metabarcoding environnemental (Krol et al., 2019; Martins et al., 2020). Une troisième alternative serait l'utilisation d'approches exploitant le « supervised machine learning » ou « apprentissage automatique supervisé » sur des données de metabarcoding environnemental, qui a été utilisée pour construire des modèles prédictifs de valeurs d'indice biotique (*i.e.* mesure de la santé d'un écosystème en se basant sur des profils de présence/absence d'espèces bio-indicatrices) indépendamment de l'assignation taxonomique des séquences d'ADNe (Cordier et al., 2017; Cordier et al., 2018). Cependant, il est à prévoir que cette limitation en termes de résolution taxonomique soit de moins en moins problématique dans le futur étant donné que les technologies de séquençage sont de plus en plus accessibles et précises (Taberlet et al., 2018).

En ce qui concerne le manque de précision dans l'estimation de l'abondance des espèces, la difficulté actuelle est, d'une part, que la concentration en ADNe a une fluctuation temporelle et spatiale du fait que ce dernier n'est pas relâché dans l'environnement de manière homogène (Jo, Murakami, Yamamoto, Masuda, & Minamoto, 2019). D'autre part, sa persistance dans l'environnement est dépendante des facteurs physico-chimiques et biologiques que nous avons vus précédemment (Barnes et al., 2014; Taberlet et al., 2018).

Pourtant ces données quantitatives sur l'abondance des organismes sont précieuses pour évaluer l'effet des changements globaux sur la santé des écosystèmes en permettant notamment de quantifier l'état d'avancement d'invasions biologiques ou l'état de santé d'espèces à risque d'extinction (Smith, 2017; Yates et al., 2020). Elles permettent également de mieux caractériser les écosystèmes étant donné que les indices de biodiversité dépendent généralement de l'abondance relative des espèces (Fedor & Zvaríková, 2019). Dans un contexte épidémiologique, le risque de transmission de maladies infectieuses est quant à lui en partie dépendant du nombre d'hôtes intermédiaires/vecteurs (Wood et al., 2019). Ces données permettent également de quantifier les interactions biotiques entre les organismes présents dans un même écosystème (Luikart, Ryman, Tallmon, Schwartz, & Allendorf, 2010; Yates et al., 2020). En dehors de l'optimisation des protocoles de création des amorces, d'extraction et d'amplification d'ADN, plusieurs outils ont été développés pour améliorer la précision des analyses de données de metabarcoding environnemental. Notamment, le développement de flux de travail « workflow » standardisés conçus pour diminuer les risques d'erreurs d'assignations taxonomiques des séquences et d'estimation d'abondances (Escudie et al., 2018; Dufresne, Lejzerowicz, Perret-Gentil, Pawlowski, & Cordier, 2019). Il existe également les modèles de mise à l'échelle allométrique « allometric scaling », qui génèrent des coefficients d'échelle allométrique à partir de données issues d'échantillons d'ADNe pouvant être convertis en estimations de biomasse ou de densités (Yates et al., 2020). Ces modèles permettent de tenir compte du fait que la production d'ADNe à l'échelle d'une population ne s'effectue pas de manière linéaire en raison des variations individuelles de taille. En menant une campagne de capture, marquage, recapture et de diagnostic ADNe sur neuf populations d'omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, l'équipe de Yates et al., 2020 a ainsi démontré que les modèles de corrélation (nombre de copies d'ADNe/masse à l'échelle allométrique) étaient plus soutenus statistiquement que les modèles classiques (nombre de copies d'ADNe/biomasse) ou (nombre de copie d'ADNe/densité d'individus) (Yates et al., 2020).

D'autres outils complémentaires à l'ADNe ont été développés ces dernières années pour permettre un suivi indirect des organismes dans leur environnement. En ce qui concerne les maladies transmises par les mollusques d'eau douce, des approches telles que l'identification des habitats de mollusques hôtes par de la surveillance spatiale ont été

développées (Gazzinelli & Kloss, 2007; Malone, Bergquist, Martins, & Luvall, 2019; Wood et al., 2019). L'objectif de ces technologies est de caractériser et de prédire les habitats susceptibles d'abriter des mollusques hôtes intermédiaires de schistosome. Ces approches exploitent l'imagerie par satellite ou de drones d'exploration qui est couplée à des données de fréquentation des sites de baignade pour cartographier les habitats d'hôtes mollusques et les sites de transmission potentiels par de l'inférence bayésienne (*i.e.* calcul de probabilités à partir de l'observation d'évènements, ces statistiques sont ensuite affinées avec le recensement de nouvelles données) (Wood et al., 2019). Contrairement à l'ADNe, ce type d'approche ne permet pas une caractérisation fine des communautés d'organismes présents, mais peut permettre dans l'avenir de cibler les sites d'intérêt pour une prospection ultérieure par ADNe.

### Au-delà du suivi environnemental, la prédiction

Un autre type d'approche d'intérêt pour le suivi de la dynamique des organismes dans l'environnement est la prédiction par modélisation de la niche écologique des organismes (Cordellier & Pfenninger, 2009; Warren & Seifert, 2011; Pedersen et al., 2014). En effet, nous avons vu que les approches basées sur l'ADNe permettent d'identifier les zones de présence d'organismes et les interactions entre les espèces présentes dans un même écosystème (Balasingham, 2016; Taberlet et al., 2018; Mulero, Toulza, et al., 2020). La collecte simultanée de données environnementales (*e.g.* pH, température, courant de l'eau, altitude etc.) sur chaque site prospecté devrait permettre de caractériser partiellement les habitats compatibles avec le développement de mollusques ou de trématodes d'intérêt médical ou vétérinaire (Mulero, Boissier, et al., 2020; Mulero, Toulza, et al., 2020). Cependant, ce type d'approche ne permet pas de prendre en compte d'autres facteurs essentiels dans un contexte épidémiologique d'émergences tel que les mouvements des populations humaines (Kincaid Smith, 2018) ou les traits d'histoire de vie des hôtes et des parasites (Mulero et al., 2019). Ces considérations soulèvent l'intérêt de coupler le diagnostic par ADNe avec des techniques de modélisation de niche écologique (ENM) afin de mieux comprendre et de prédire la dynamique des trématodes et de leurs hôtes mollusques dans l'espace et le temps (Kincaid-Smith et al., 2017; Mulero, Boissier, et al., 2020). En effet, la modélisation de niche écologique permet d'identifier les sites favorables au développement d'un organisme en se basant sur des données d'occurrences associées à des données environnementales biotiques



et abiotiques (Warren & Seifert, 2011). Comme ces technologies exploitent des matrices de données spatialisées, il est possible d'ajouter dans ces modèles une grande diversité de données (Warren & Seifert, 2011). À partir de ces données et en faisant varier les scénarii climatiques dans les années futures, il est possible de prédire la fluctuation dans le temps de la « compatibilité » d'un habitat avec le développement d'une espèce en partant du postulat que la niche écologique de cette dernière est stable dans le temps (Cordellier & Pfenninger, 2009). C'est pourquoi ces approches sont particulièrement utiles dans les contextes d'invasions biologiques ou d'émergences de maladies infectieuses pour prédire la dynamique des espèces nouvellement introduites dans un environnement d'accueil (Warren & Seifert, 2011; Escobar & Craft, 2016; Pech-May et al., 2016).

C'est pour ces diverses raisons que les modèles ENM se sont démocratisés en parasitologie pour comprendre et prédire les dynamiques de parasites, d'hôtes et de vecteurs de parasites en réponse aux changements globaux (Escobar & Craft, 2016). En ce qui concerne les maladies transmises par les mollusques d'eau douce, de tels outils ont déjà été appliqués à l'échelle de pays ou continents. C'est le cas, par exemple, pour faire une prédiction de l'aire de répartition de *Radix balthica*, un hôte intermédiaire de parasites du genre *Trichobilharzia* responsables de la dermatite du nageur chez l'Homme. Ces approches ont permis de modéliser l'expansion future de ce mollusque dans plusieurs pays d'Europe (Cordellier & Pfenninger, 2009). Au Zimbabwe, les approches ENM ont permis de modéliser la dynamique spatiale de *Bulinus globosus* et de *B. pfeifferi*, tous deux hôtes intermédiaires de schistosomes de l'Homme, ainsi que *Radix natalensis* un hôte intermédiaire de *Fasciola gigantica* (Pedersen et al., 2014). Dans ce dernier exemple, l'étude de Pedersen a permis de déterminer que conjointement aux augmentations de température en cours, les aires compatibles avec la transmission de bilharziose intestinale par *B. pfeifferi* au Zimbabwe devraient augmenter jusqu'en 2050, avant de grandement diminuer les années qui suivront (*i.e.* 2050-2100), car les températures prédites deviendront trop élevées pour permettre à l'hôte mollusque de se développer (Pedersen et al., 2014). Ces résultats rejoignent l'idée que les aires de répartition des bilharzioses dans le monde devraient se décaler vers le Nord dans les prochaines années en réponse aux changements globaux (Kim et al., 2014).

Cependant, pour que les modèles ENM proposent des résultats robustes et puissent considérer au mieux la complexité d'un environnement naturel, il est nécessaire de disposer

d'une grande quantité de données d'occurrences d'espèces et de données environnementales (Escobar & Craft, 2016), en particulier pour déterminer la compatibilité d'un environnement dans lesquels l'espèce étudiée n'a jamais été reportée (Escobar & Craft, 2016). De plus, ces approches de modélisation se basent généralement sur des données de présence/absence d'espèces récoltées par des méthodes de prospection visuelles. Or nous avons vu avec l'exemple des mollusques, que ces approches ne permettent pas d'identifier l'ensemble des espèces présentes dans un environnement en une seule prospection (Lamy et al., 2012; Dubart et al., 2019). Ces méthodes dites classiques ne permettent donc pas de s'assurer de l'absence d'une espèce, une limitation qui théoriquement impacte moins les approches ADNe compte tenue de la meilleure sensibilité de la méthode et de sa capacité de détection indirecte (Taberlet et al., 2018; Mulero, Toulza, et al., 2020). Enfin les techniques de modélisation ne prennent pas systématiquement en compte d'autres paramètres influençant la répartition des espèces comme leur capacité d'adaptation des organismes et les interactions biotiques de ces derniers avec les autres espèces présentes dans l'environnement (Escobar & Craft, 2016).

### **Perspectives et recommandations pour les stratégies de contrôle de maladies infectieuses transmises par les mollusques d'eau douce**

Depuis peu, L'OMS a reconnu que les efforts menés depuis les années 70 pour l'élimination des bilharzioses par le traitement de masse au praziquantel ont été inefficaces dans certaines régions du globe (Wood et al., 2019; WHO, 2020). C'est dans ce contexte que les stratégies de contrôle mondiales des bilharzioses ont été réorientées vers le contrôle des populations d'hôtes mollusques pour poursuivre les efforts d'élimination en s'attaquant au cycle parasitaire avant qu'il ne concerne l'Homme ou les élevages (WHO, 2020). En effet, il a été démontré, dans les zones d'endémies, qu'il y avait une corrélation positive entre l'abondance de mollusques hôtes et la prévalence de bilharzioses (Wood et al., 2019). Cette décision s'inscrit dans le cadre plus général des approches One Health pour la lutte contre les maladies infectieuses (Destoumieux-Garzon et al., 2018), elle fait suite à la résolution WHA70.16 prise en 2017 par l'OMS pour développer des stratégies internationales basées sur le contrôle des populations de vecteurs pour réduire d'au moins 40% l'incidence des maladies infectieuses vectorielles d'ici 2025, en incluant les bilharzioses (WHO, 2020). En dehors des

bilharzioses, nous avons vu avec les changements globaux que les maladies infectieuses en général constituent un risque grandissant d'émergences dans les pays où elles sont non endémiques (Jones et al., 2008; Morand, 2020). Rien que pour les bilharzioses, les données relevées par Santé Publique France font état de 2000 cas d'importation par an en France (Noel et al., 2018), la majorité de ces personnes sont asymptomatiques (Ramalli et al., 2018) et représentent un risque d'introduction de ces parasites (Kincaid Smith, 2018). Avec le réchauffement global, l'accélération d'événements climatiques extrêmes ainsi que les crises sociales et économiques qui en découlent (IPCC, 2019a), il est attendu que les flux mondiaux de population humaine et animale s'accroissent dans les prochaines années (World Bank, 2010), bien que le contexte sanitaire actuel démontre qu'il puisse y avoir des exceptions (Chatterjee et al., 2020). Ainsi, il faut prêter une attention toute particulière à l'intensification de ces flux et de leur impact sur la dynamique de transmission de maladies infectieuses. La Banque Mondiale « World Bank » a estimé en 2018 que ces divers changements allaient générer plus de 143 millions de migrants et de réfugiés climatiques provenant principalement de l'Amérique latine, L'Afrique Sub-Saharienne et le sud-est de l'Asie (Rigaud et al., 2018), qui sont toutes des zones d'endémie de plusieurs maladies infectieuses, notamment de bilharzioses (Boissier et al., 2019).

Dans ce contexte et à l'issue de ce travail de thèse nous avons développé et répertorié un ensemble d'outils de suivis environnementaux permettant de proposer un plan d'action intégratif en 4 phases pour le suivi et le contrôle de maladies infectieuses transmises par les mollusques d'eau douce. Ce programme intègre les diagnostics environnementaux aux diagnostics médicaux et vétérinaires existants. L'objectif est de dresser un état des lieux de ces maladies en tenant compte, comme c'est déjà le cas, de la présence du parasite dans les hôtes définitifs Humains et domestiques, mais en intégrant des données précises sur la présence du parasite dans les hôtes mollusques et dans l'environnement. Cette nouvelle approche de caractérisation va permettre de cibler l'application de moyens de lutte existant pour enrayer plus efficacement le cycle parasitaire, et de paver la voie au développement de nouvelles stratégies de lutte.

- La phase 1 ou phase de caractérisation :

(i) Caractérisation des habitats favorables par l'identification et/ou la prédiction des habitats susceptibles d'accueillir des mollusques hôtes par des approches de surveillance spatiale (Malone et al., 2019; Wood et al., 2019). Pour les régions de non-endémie, il serait important de focaliser sur les régions connues pour accueillir des flux migratoires en provenance des zones d'endémie. Pour les régions d'endémies, l'intérêt pourrait porter principalement sur les foyers de transmission actifs (*i.e.* présence du parasite et de cas humains et/ou d'élevages infectés) et sur les sites d'eau douce fréquentés par l'Homme ou par les élevages.

(ii) Caractérisation des sites potentiels (*i.e.* présence avérée d'hôtes mollusques), soit la caractérisation par metabarcoding environnemental des communautés globales au sein de ces habitats. Cette étape vise à mettre à jour de la distribution géographique des communautés de mollusques d'eau douce (Mulero, Toulza, et al., 2020) et de celles des prédateurs ou compétiteurs naturels de mollusques tels que les poissons et les décapodes (Hung et al., 2013; Cilleros et al., 2019).

(iii) Caractérisation des sites à risque de transmission (*i.e.* présence du pathogène) en caractérisant les communautés de trématodes par metabarcoding environnemental et en mettant à jour la distribution géographique de ces communautés.

La consolidation éventuelle des données obtenues par metabarcoding environnemental sur des espèces d'intérêt (*e.g.* mollusques hôtes et trématodes), par de la prospection malacologique conventionnelle et/ou du diagnostic ADNe ciblé pour les mollusques, et par du diagnostic intramolluscal par RD-PCR et/ou par séquençage ciblé d'amplicons TAS pour les parasites. Cette étape pourrait s'effectuer en cas de doutes ou d'anomalies (*e.g.* identification de cas humains ou d'élevages infectés malgré une absence du parasite et/ou de mollusques sur les sites alentour).

(iv) Mise en place de campagnes ciblées de diagnostics médicaux ou vétérinaires dans les populations et élevages aux alentours des sites à risques de transmission nouvellement identifiés.

- La phase 2 ou phase de lutte à court terme, en exploitant des méthodes de lutte déjà existantes pour enrayer le cycle parasitaire :

(i) Mise en place de campagnes de traitements ciblées aux antihelminthiques (*e.g.* Praziquantel, Ivermectine) dans les populations et élevages vivant à proximité des foyers de transmission nouvellement identifiés.

(ii) Mise en place de stratégies d'évitement des foyers de transmission actifs et sites à risque de transmission nouvellement identifié (*e.g.* interdiction temporaire de baignade et de pâturage) comme cela est déjà fait pour des maladies comme la fasciolose (Selemetas et al., 2015; Sabourin, 2018).

(iii) Sensibilisation des usagers par de l'affichage aux abords des sites présentant un risque infectieux et la mise à dispositions de toilettes sèches, comme cela est déjà fait en Afrique et en Corse (Kincaid Smith, 2018). Et par la sensibilisation des personnels médicaux lors de formations sur la reconnaissance des symptômes, sur les outils de diagnostics et traitements existants et sur le référencement des cas et des sites d'eau douce que ces derniers ont fréquentés.

- La phase 3 ou phase de lutte à long terme :

(i) Par des approches visant à diminuer la densité des populations de mollusques hôtes comme la destruction de leurs habitats (*e.g.* élimination des herbiers sur le bord des sites d'eau douce, Wood et al., 2019) ou l'utilisation de molluscicides tels que les composés chimiques dérivés du niclosamide déjà utilisé à cette fin (WHO, 2020). Ce sont toutes deux des approches déjà existantes qui nécessitent un suivi des populations de mollusques que l'ADNe va permettre de réaliser à large échelle.

(ii) Par la mise en place de programmes d'amélioration des infrastructures d'assainissement de l'eau et d'accès à l'eau. Ainsi qu'un renforcement de l'éducation sanitaire des populations dans ces régions (WHO, 2020).

(iii) Par la mise en place de programmes d'introductions ciblés d'espèces prédatrices ou compétitrices de mollusques telles que les poissons ou les décapodes d'eau douce, à des fins de lutte biologique (Slootweg, 1995; Pointier & David, 2004; Hung et al., 2013). En se basant



sur une étude approfondie des assemblages d'espèces mis en évidence par le metabarcoding environnemental.

- Enfin, la phase 4 ou phase de surveillance et de projection.

(i) Par une surveillance par ADNe des populations d'hôtes mollusques et de trématodes d'intérêt médical et/ou vétérinaire, en favorisant les approches ADNe ciblées pour limiter le coût par rapport à un metabarcoding environnemental et la main d'œuvre requise par un suivi malacologique classique (Mulero, Boissier, et al., 2020).

Pour les parasites, d'autres techniques comme celles exploitant des hôtes intermédiaires et définitifs sentinelle pourraient également être envisagées (Emukah et al., 2012; Allan et al., 2013).

(ii) Par l'étude du potentiel adaptatif et invasif des hôtes mollusques qui, nous l'avons mis en évidence, sont l'élément le plus limitant dans la capacité à disperser de trématodes tels que les schistosomes. Par exemple, il paraît important de mener des études similaires à celles que nous avons menées sur la thermotolérance de *B. truncatus* sur des mollusques du genre *Biomphalaria*. En effet, ces derniers présentent un fort potentiel à coloniser de nouveaux environnements (Pointier, David, & Jarne, 2005) et constituent un risque d'émergence future de bilharziose intestinale en Europe.

(iii) Par une projection de l'évolution future de la dynamique des maladies infectieuses transmises par les mollusques d'eau douce par modélisation mathématique. Toutes les données acquises lors des précédentes phases pourraient alimenter les modèles mathématiques permettant de prédire ces dynamiques globales en faisant varier les scénarii climatiques prédits. Ce type d'approche permettrait également une caractérisation de la niche des espèces de mollusques et de trématodes étudiées (Cordellier & Pfenninger, 2009; Kincaid-Smith et al., 2017; Kincaid Smith, 2018; Mulero et al., 2019).

## Bibliographie

---

- Abbasi, I., Hamburger, J., Kariuki, C., Mungai, P. L., Muchiri, E. M., & King, C. H. (2012). Differentiating *Schistosoma haematobium* from related animal schistosomes by PCR amplifying inter-repeat sequences flanking newly selected repeated sequences. *Am J Trop Med Hyg*, 87(6), 1059-1064. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0243
- Adams, C. I. M., Knapp, M., Gemmell, N. J., Jeunen, G. J., Bunce, M., Lamare, M. D., & Taylor, H. R. (2019). Beyond Biodiversity: Can Environmental DNA (eDNA) Cut It as a Population Genetics Tool? *Genes (Basel)*, 10(3). doi:10.3390/genes10030192
- Ahmed, M., Back, M. A., Prior, T., Karssen, G., Lawson, R., Adams, I., & Sapp, M. (2019). Metabarcoding of soil nematodes: the importance of taxonomic coverage and availability of reference sequences in choosing suitable marker(s). *Metabarcoding and Metagenomics*, 3. doi:10.3897/mbmg.3.36408
- Aivelo, T., & Medlar, A. (2018). Opportunities and challenges in metabarcoding approaches for helminth community identification in wild mammals. *Parasitology*, 145(5), 608-621. doi:10.1017/S0031182017000610
- Ajibola, O., Gulumbe, B. H., Eze, A. A., & Obishakin, E. (2018). Tools for Detection of Schistosomiasis in Resource Limited Settings. *Med Sci (Basel)*, 6(2), 39. doi:10.3390/medsci6020039
- Akpor, O. B., Otohinoyi, D. A., Olaolu, D. T., & Aderiye, B. I. (2014). Pollutants in wastewater effluents: impacts and remediation processes. *International Journal of Environmental Research and Earth Science*, 3(3), 50-59.
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P., Bohmann, K., & Mahon, A. (2018). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(1), 134-147. doi:10.1111/2041-210x.12849
- Allan, F., Dunn, A. M., Emery, A. M., Stothard, J. R., Johnston, D. A., Kane, R. A., . . . Rollinson, D. (2013). Use of sentinel snails for the detection of *Schistosoma haematobium* transmission on Zanzibar and observations on transmission patterns. *Acta Trop*, 128(2), 234-240. doi:10.1016/j.actatropica.2013.01.003
- Alzaylaee, H., Collins, R. A., Rinaldi, G., Shechonge, A., Ngatunga, B., Morgan, E. R., & Genner, M. J. (2020). *Schistosoma* species detection by environmental DNA assays in African freshwaters. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(3), e0008129. doi:10.1371/journal.pntd.0008129
- Alzaylaee, H., Collins, R. A., Shechonge, A., Ngatunga, B. P., Morgan, E. R., & Genner, M. J. (2020). Environmental DNA-based xenomonitoring for determining *Schistosoma* presence in tropical freshwaters. *Parasit Vectors*, 13(1), 63. doi:10.1186/s13071-020-3941-6
- Amarista, M., Niquil, N., Balzan, C., & Pointier, J.-P. (2001). Interspecific competition between freshwater snails of medical importance: a Venezuelan example. *Comptes Rendus de*

- l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 324(2), 143-148.  
doi:10.1016/s0764-4469(00)01280-4
- Ardila, A. (2016). The Evolutionary Concept of "Preadaptation" Applied to Cognitive Neurosciences. *Front Neurosci*, 10, 103. doi:10.3389/fnins.2016.00103
- Arndt, D. S., Baringer, M. O., & Johnson, M. R. (2010). State of the Climate in 2009. *Bull. Amer. Meteor. Soc.*, 91(6), S1-S224.
- Arostegui, M. C., Wood, C. L., Jones, I. J., Chamberlin, A. J., Jouanard, N., Faye, D. S., . . . Sokolow, S. H. (2019). Potential Biological Control of Schistosomiasis by Fishes in the Lower Senegal River Basin. *Am J Trop Med Hyg*, 100(1), 117-126. doi:10.4269/ajtmh.18-0469
- ARS. (2019, 2019). Qualité des eaux de baignade. *French minister for Solidarity and Health*. Retrieved from <http://baignades.sante.gouv.fr/baignades/navigMap.do?idCarte=fra#a>
- Balasingham, K. D. (2016). *Environmental DNA detection as an effective tool for delimiting spatial distribution of rare and invasive species, and assessing community in flowing, freshwater ecosystems*. University of Windsor, Electronic Theses and Dissertations. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/ENVIRONMENTAL-DNA-DETECTION-AS-AN-EFFECTIVE-TOOL-OF-Balasingham/e51ac3270fb68f981443cd5d35ad776d6ba7e522>
- Baldauf, R. W., Lane, D. D., & Marote, G. A. (2001). Ambient Air Quality Monitoring Network Design for Assessing Human Health Impacts from Exposures to Airborne Contaminants. *Environmental Monitoring and Assessment*, 66(1), 63-76. doi:10.1023/A:1026428214799
- Balint, M., Nowak, C., Marton, O., Pauls, S. U., Wittwer, C., Aramayo, J. L., . . . Jansen, M. (2018). Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Mol Ecol Resour*, 18(6), 1415-1426. doi:10.1111/1755-0998.12934
- Balint, M., Pfenninger, M., Grossart, H. P., Taberlet, P., Vellend, M., Leibold, M. A., . . . Bowler, D. (2018). Environmental DNA Time Series in Ecology. *Trends Ecol Evol*, 33(12), 945-957. doi:10.1016/j.tree.2018.09.003
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environ Sci Technol*, 48(3), 1819-1827. doi:10.1021/es404734p
- Basch, P. F. (1991). Schistosomes: development, reproduction, and host relations. *New York : Oxford University Press*, 1991, 7, 248.
- Basch, P. F., & DiConza, J. J. (1975). Predation by Echinostome Rediae upon Schistosome Sporocysts *In vitro*. *The Journal of Parasitology*, 61(6). doi:10.2307/3279371

- Bass, D., Stentiford, G. D., Littlewood, D. T. J., & Hartikainen, H. (2015). Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. *Trends Parasitol*, 31(10), 499-513. doi:10.1016/j.pt.2015.06.013
- Bauer, A., Haine, E. R., Perrot-Minnot, M.-J., & Rigaud, T. (2005). The acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* alters the geotactic and clinging behaviours of two sympatric amphipod hosts: the native *Gammarus pulex* and the invasive *Gammarus roeselii*. *Journal of Zoology*, 267(01). doi:10.1017/s0952836905007223
- Bausch, D. G., & Schwarz, L. (2014). Outbreak of ebola virus disease in Guinea: where ecology meets economy. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e3056. doi:10.1371/journal.pntd.0003056
- Becker, J. M., Ganatra, A. A., Kandie, F., Muhlbauer, L., Ahlheim, J., Brack, W., . . . Liess, M. (2020). Pesticide pollution in freshwater paves the way for schistosomiasis transmission. *Sci Rep*, 10(1), 3650. doi:10.1038/s41598-020-60654-7
- Beesley, N. J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R. J., Hodgkinson, J. E., Martinez-Moreno, A., . . . Williams, D. J. L. (2018). *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis*, 65 Suppl 1, 199-216. doi:10.1111/tbed.12682
- Beisel, J. N., & Médoc, V. (2010). Bird and amphipod parasites illustrate a gradient from adaptation to exaptation in complex life cycle. *Ethology Ecology & Evolution*, 22(3), 265-270. doi:10.1080/03949370.2010.502321
- Belle, C. C., Stoeckle, B. C., & Geist, J. (2019). Taxonomic and geographical representation of freshwater environmental DNA research in aquatic conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(11), 1996-2009. doi:10.1002/aqc.3208
- Berry, A., Fillaux, J., Martin-Blondel, G., Boissier, J., Iriart, X., Marchou, B., . . . Delobel, P. (2016). Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Euro Surveill*, 21(1). doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.1.30100
- Berry, A., Mone, H., Iriart, X., Mouahid, G., Aboo, O., Boissier, J., . . . Magnaval, J. F. (2014). *Schistosomiasis haematobium*, Corsica, France. *Emerg Infect Dis*, 20(9), 1595-1597. doi:10.3201/eid2009.140928
- Bigna, J. J., & Noubiap, J. J. (2019). The rising burden of non-communicable diseases in sub-Saharan Africa. *The Lancet Global Health*, 7(10), e1295-e1296. doi:10.1016/s2214-109x(19)30370-5
- Bik, H. M., Porazinska, D. L., Creer, S., Caporaso, J. G., Knight, R., & Thomas, W. K. (2012). Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends Ecol Evol*, 27(4), 233-243. doi:10.1016/j.tree.2011.11.010
- Bilharz, T. M. (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, 72.

- Black, R., Adger, W. N., Arnell, N. W., Dercon, S., Geddes, A., & Thomas, D. (2011). The effect of environmental change on human migration. *Global Environmental Change*, 21, S3-S11. doi:10.1016/j.gloenvcha.2011.10.001
- Blettler, M. C. M., Abrial, E., Khan, F. R., Sivri, N., & Espinola, L. A. (2018). Freshwater plastic pollution: Recognizing research biases and identifying knowledge gaps. *Water Res*, 143, 416-424. doi:10.1016/j.watres.2018.06.015
- Blum, A. J., & Hotez, P. J. (2018). Global "worming": Climate change and its projected general impact on human helminth infections. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(7), e0006370. doi:10.1371/journal.pntd.0006370
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., . . . de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol Evol*, 29(6), 358-367. doi:10.1016/j.tree.2014.04.003
- Boissier, J., Grech-Angelini, S., Webster, B. L., Allienne, J. F., Huyse, T., Mas-Coma, S., . . . Mita, G. (2016). Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect Dis*, 16(8), 971-979. doi:10.1016/S1473-3099(16)00175-4
- Boissier, J., Kincaid-Smith, J., Berry, A., Allienne, J. F., Fillaux, J., & Toulza, E. (2015). [Global changes and snail-borne disease: an hybrid schistosome reaches Europe]. *Med Sci (Paris)*, 31(11), 962-964. doi:10.1051/medsci/20153111008
- Boissier, J., Mone, H., Mita, G., Bargues, M. D., Molyneux, D., & Mas-Coma, S. (2015). Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infect Dis*, 15(7), 757-758. doi:10.1016/S1473-3099(15)00084-5
- Boissier, J., Mouahid, G., & Mone, H. (2019). *Schistosoma* spp. Retrieved from <http://www.waterpathogens.org/book/schistosoma>
- Bond, N. R., Lake, P. S., & Arthington, A. H. (2008). The impacts of drought on freshwater ecosystems: an Australian perspective. *Hydrobiologia*, 600(1), 3-16. doi:10.1007/s10750-008-9326-z
- Bongaarts, J. (2009). Human population growth and the demographic transition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1532), 2985-2990. doi:10.1098/rstb.2009.0137
- Born-Torrijos, A., Poulin, R., Raga, J. A., & Holzer, A. S. (2014). Estimating trematode prevalence in snail hosts using a single-step duplex PCR: how badly does cercarial shedding underestimate infection rates? *Parasit Vectors*, 7, 243. doi:10.1186/1756-3305-7-243
- Bouchet, P., Falkner, G., & Seddon, M. B. (1999). Lists of protected land and freshwater molluscs in the Bern Convention and European Habitats Directive: are they relevant to conservation? *Biological Conservation*, 90(1), 21-31.



- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour*, 16(1), 176-182. doi:10.1111/1755-0998.12428
- Brockwell, Y. M., Spithill, T. W., Anderson, G. R., Grillo, V., & Sangster, N. C. (2013). Comparative kinetics of serological and coproantigen ELISA and faecal egg count in cattle experimentally infected with *Fasciola hepatica* and following treatment with triclabendazole. *Vet Parasitol*, 196(3-4), 417-426. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.012
- Buttel, F. H., Hawkins, A. P., & Power, A. G. (1990). *From limits to growth to global change: Constraints and contradictions in the evolution of environmental science and ideology*. Paper presented at the Global Environmental Change.
- Camill, P. (2010). Global Change: An Overview. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 49.
- Campbell, S. J., Stothard, J. R., O'Halloran, F., Sankey, D., Durant, T., Ombede, D. E., . . . Tchuem-Tchuente, L. A. (2017). Urogenital schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis (STH) in Cameroon: An epidemiological update at Barombi Mbo and Barombi Kotto crater lakes assessing prospects for intensified control interventions. *Infect Dis Poverty*, 6(1), 49. doi:10.1186/s40249-017-0264-8
- Canning, A. D., & Death, R. G. (2019). Ecosystem Health Indicators—Freshwater Environments. In *Encyclopedia of Ecology* (pp. 46-60).
- Capinha, C., Essl, F., Seebens, H., Moser, D., & Pereira, H. M. (2015). The dispersal of alien species redefines biogeography in the Anthropocene. *Science*, 348(6240), 1248-1251. doi:10.1126/science.aaa8913
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., . . . Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59-67. doi:10.1038/nature11148
- Catalano, S., Sene, M., Diouf, N. D., Fall, C. B., Borlase, A., Leger, E., . . . Webster, J. P. (2018). Rodents as Natural Hosts of Zoonotic *Schistosoma* Species and Hybrids: An Epidemiological and Evolutionary Perspective From West Africa. *J Infect Dis*, 218(3), 429-433. doi:10.1093/infdis/jiy029
- Cavin, L. (2017). Front matter, Copyright, Foreword, Introduction. In *Freshwater Fishes: 250 Million Years of Evolutionary History* (pp. 214): Elsevier Ltd.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., & Dirzo, R. (2017). Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(30), E6089-E6096. doi:10.1073/pnas.1704949114
- Cedeno-Leon, A., & Thomas, J. D. (1982). Competition Between *Biomaphalaria glabrata* (Say) and *Marisa cornuarietis* (L.): Feeding Niches. *The Journal of Applied Ecology*, 19(3). doi:10.2307/2403276

- Chansigaud, V. (2013). De l'action humaine sur la géographie physique. *Sciences de la Terre*. Retrieved from <http://journals.openedition.org/bibnum/473>
- Charbonnel, N., Angers, B., Rasatavonjizay, R., Bremond, P., Debain, C., & Jarne, P. (2002). The influence of mating system, demography, parasites and colonization on the population structure of *Biomphalaria pfeifferi* in Madagascar. *Mol Ecol*, 11(11), 2213-2228. doi:10.1046/j.1365-294x.2002.01586.x
- Chatterjee, P., Nagi, N., Agarwal, A., Das, B., Banerjee, S., Sarkar, S., . . . Gangakhedkar, R. R. (2020). The 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) pandemic: A review of the current evidence. *Indian J Med Res*, 151(2 & 3), 147-159. doi:10.4103/ijmr.IJMR\_519\_20
- Chu, K. Y., Sabbaghian, H., & Massoud, J. (1966). Host-parasite Relationship of *Bulinus Truncatus* and *Schistosoma Haematobium* in Iran. 2. Effect of Exposure Dosage of Miracidia on the Biology of the Snail Host and the Development of the Parasites *Bull World Health Organ*, 34(1), 121-130.
- Church, J. A., Clark, P. U., Cazenave, A., Gregory, J. M., Jevrejeva, S., Levermann, A., . . . Unnikrishna, A. S. (2013). Sea Level Change. In T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, & P. M. Midgle (Eds.), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Vol. 5). Cambridge: Cambridge University Press.
- Cilleros, K., Valentini, A., Allard, L., Dejean, T., Etienne, R., Grenouillet, G., . . . Brosse, S. (2019). Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): A test with Guianese freshwater fishes. *Mol Ecol Resour*, 19(1), 27-46. doi:10.1111/1755-0998.12900
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D67-D72. doi:10.1093/nar/gkv1276
- Clusa, L., Miralles, L., Basanta, A., Escot, C., & Garcia-Vazquez, E. (2017). eDNA for detection of five highly invasive molluscs. A case study in urban rivers from the Iberian Peninsula. *PLoS One*, 12(11), e0188126. doi:10.1371/journal.pone.0188126
- Cnops, L., Soentjens, P., Clerinx, J., & Van Esbroeck, M. (2013). A *Schistosoma haematobium*-specific real-time PCR for diagnosis of urogenital schistosomiasis in serum samples of international travelers and migrants. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8), e2413. doi:10.1371/journal.pntd.0002413
- Cohen, J. E. (1995). Population growth and earth's human carrying capacity. *Science*, 269(5222), 341-346. doi:10.1126/science.7618100
- Coissac, E., Riaz, T., & Puillandre, N. (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Mol Ecol*, 21(8), 1834-1847. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x

- Collen, B., Whitton, F., Dyer, E. E., Baillie, J. E., Cumberlidge, N., Darwall, W. R., . . . Bohm, M. (2014). Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. *Glob Ecol Biogeogr*, 23(1), 40-51. doi:10.1111/geb.12096
- Combes, C. (2001). *Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions* (Vol. 124): University of Chicago Press.
- Combes, C., & Moné, H. (1987). Possible mechanisms of the decoy effect in *Schistosoma mansoni* transmission. *International Journal for Parasitology*, 17(4), 971-975. doi:10.1016/0020-7519(87)90017-8
- Comte, L., Buisson, L., Daufresne, M., & Grenouillet, G. (2013). Climate-induced changes in the distribution of freshwater fish: observed and predicted trends. *Freshwater Biology*, 58(4), 625-639. doi:10.1111/fwb.12081
- Cordellier, M., & Pfenninger, M. (2009). Inferring the past to predict the future: climate modelling predictions and phylogeography for the freshwater gastropod *Radix balthica* (*Pulmonata*, *Basommatophora*). *Mol Ecol*, 18(3), 534-544. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.04042.x
- Cordier, T., Alonso-Saez, L., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Aylagas, E., Bohan, D. A., Bouchez, A., . . . Lanzen, A. (2020). Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: a review of current strategies with an implementation roadmap. *Mol Ecol*. doi:10.1111/mec.15472
- Cordier, T., Esling, P., Lejzerowicz, F., Visco, J., Ouadahi, A., Martins, C., . . . Pawlowski, J. (2017). Predicting the Ecological Quality Status of Marine Environments from eDNA Metabarcoding Data Using Supervised Machine Learning. *Environ Sci Technol*, 51(16), 9118-9126. doi:10.1021/acs.est.7b01518
- Cordier, T., Forster, D., Dufresne, Y., Martins, C. I. M., Stoeck, T., & Pawlowski, J. (2018). Supervised machine learning outperforms taxonomy-based environmental DNA metabarcoding applied to biomonitoring. *Mol Ecol Resour*, 18(6), 1381-1391. doi:10.1111/1755-0998.12926
- Corlett, R. T. (2015). The Anthropocene concept in ecology and conservation. *Trends Ecol Evol*, 30(1), 36-41. doi:10.1016/j.tree.2014.10.007
- Costanza, R., d'Arge, R., deGroot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., . . . van den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387, 253-260.
- Cowie, R., & Robinson, D. (2003). Pathways of Introductions of Nonindigenous Land and Freshwater Snails and Slugs. In G. M. Ruiz & J. T. Carlton (Eds.), *Invasive species: vectors and management strategies* (1 ed., pp. 93-122): Island Press.
- Crutzen, P. J., & Stoermer, E. F. (2000). The "Anthropocene". *IGBP Newsletter*(41), 17-18.

- Davidson, A. M., Jennions, M., & Nicotra, A. B. (2011). Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. *Ecol Lett*, 14(4), 419-431. doi:10.1111/j.1461-0248.2011.01596.x
- de Jager, D., Manning, M., Kuijpers, L., Andersen, S. O., Ashford, P., Atkins, P., . . . Yamabe, M. (2005). Safeguarding the Ozone Layer and the Global Climate System: Issues Related to Hydrofluorocarbons and Perfluorocarbons. *IPCC SRCCL*, 478. doi:10.13140/2.1.4337.2161
- de Lamarck, J. B. (1817). *Homme, un nouveau dictionnaire d'histoire naturelle appliquée aux arts, à l'agriculture, à l'économie rurale et domestique, à la médecine* (Vol. 15). Deterville, Paris: Jean François Pierre Deterville.
- De Vos, J. M., Joppa, L. N., Gittleman, J. L., Stephens, P. R., & Pimm, S. L. (2015). Estimating the normal background rate of species extinction. *Conserv Biol*, 29(2), 452-462. doi:10.1111/cobi.12380
- Deagle, B. E., Jarman, S. N., Coissac, E., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biol Lett*, 10(9). doi:10.1098/rsbl.2014.0562
- Deiner, K., Bik, H. M., Machler, E., Seymour, M., Lacoursiere-Roussel, A., Altermatt, F., . . . Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol Ecol*, 26(21), 5872-5895. doi:10.1111/mec.14350
- Deiner, K., Fronhofer, E. A., Machler, E., Walser, J. C., & Altermatt, F. (2016). Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nat Commun*, 7, 12544. doi:10.1038/ncomms12544
- Deininger, P. L. (1983). Random subcloning of sonicated DNA: application to shotgun DNA sequence analysis. *Anal Biochem*, 129(1), 216-223. doi:10.1016/0003-2697(83)90072-6
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011). Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 6(8), e23398. doi:10.1371/journal.pone.0023398
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), 953-959. doi:10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x
- Delić, T., & Fišer, C. (2019). Species interactions. In *Encyclopedia of Caves* (pp. 967-973).
- Destoumieux-Garzon, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., . . . Voituron, Y. (2018). The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front Vet Sci*, 5, 14. doi:10.3389/fvets.2018.00014

- Dickie, I. A., Boyer, S., Buckley, H. L., Duncan, R. P., Gardner, P. P., Hogg, I. D., . . . Weaver, L. (2018). Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. *Mol Ecol Resour*. doi:10.1111/1755-0998.12907
- Dillon, R. T. (2000). Predation. In *The Ecology of Freshwater Molluscs* (pp. 273-325).
- Dimijian, G. G. (2000). Pathogens and parasites: strategies and challenges. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 13(1), 19-29. doi:10.1080/08998280.2000.11927638
- Doby, J. M., Rault, B., Deblock, S., & Chabaud, A. (1966a). Bullins et bilharzioses en Corse. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 41(4), 337-349. doi:10.1051/parasite/1966414337
- Doby, J. M., Rault, B., Deblock, S., & Chabaud, A. (1966b). Snails and bilharziasis in Corsica. Distribution, frequency and biology of "*Bulinus truncatus*". *Ann Parasitol Hum Comp*, 41(4), 337-349.
- Doi, H., Takahara, T., Minamoto, T., Matsushashi, S., Uchii, K., & Yamanaka, H. (2015). Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species. *Environ Sci Technol*, 49(9), 5601-5608. doi:10.1021/acs.est.5b00253
- Dubart, M., Pantel, J. H., Pointier, J. P., Jarne, P., & David, P. (2019). Modeling competition, niche, and coexistence between an invasive and a native species in a two-species metapopulation. *Ecology*, 100(6), e02700. doi:10.1002/ecy.2700
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z., Knowler, D. J., Leveque, C., . . . Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 81(2), 163-182. doi:10.1017/S1464793105006950
- Dufresne, Y., Lejzerowicz, F., Perret-Gentil, L. A., Pawlowski, J., & Cordier, T. (2019). SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 88. doi:10.1186/s12859-019-2663-2
- ECDC. (2011). VBORNET, European Network for Arthropod Vector Surveillance for Human Public Health. Retrieved from <http://www.vbornet.eu/>
- ECDC. (2012). Guidelines for the Surveillance of Invasive Mosquitoes in Europe. *ECDC*. doi:10.2900/61134
- Eduscol. (2017, 2019). Changement environnemental global, changements globaux. *Ressource de géographie pour les enseignants*. Retrieved from <http://geoconfluences.ens-lyon.fr/glossaire/changements-globaux>
- El-Hassan, A. A. (1974). Laboratory studies on the direct effect of temperature on *Bulinus truncatus* and *Biomphalaria alexandrina*, the snail intermediate hosts of schistosomes in Egypt. *Folia Parasitol (Praha)*, 21(2), 181-187.



- Ellwanger, J. H., Kaminski, V. L., & Chies, J. A. B. (2019). Emerging infectious disease prevention: Where should we invest our resources and efforts? *J Infect Public Health*, 12(3), 313-316. doi:10.1016/j.jiph.2019.03.010
- Emukah, E., Gutman, J., Eguagie, J., Miri, E. S., Yinkore, P., Okocha, N., . . . Richards, F. O. (2012). Urine heme dipsticks are useful in monitoring the impact of praziquantel treatment on *Schistosoma haematobium* in sentinel communities of Delta State, Nigeria. *Acta Trop*, 122(1), 126-131. doi:10.1016/j.actatropica.2012.01.002
- Epp, L. S., Zimmermann, H. H., & Stoof-Leichsenring, K. R. (2019). Sampling and Extraction of Ancient DNA from Sediments. *Methods Mol Biol*, 1963, 31-44. doi:10.1007/978-1-4939-9176-1\_5
- Eppert, A., Lewis, F. A., Grzywacz, C., Coura-Filho, P., Caldas, I., & Minchella, D. J. (2002). Distribution of Schistosome Infections in Molluscan Hosts at Different Levels of Parasite Prevalence. *Journal of Parasitology*, 88(2), 232-236. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0232:Dosiim]2.0.Co;2
- Escobar, L. E., & Craft, M. E. (2016). Advances and Limitations of Disease Biogeography Using Ecological Niche Modeling. *Front Microbiol*, 7, 1174. doi:10.3389/fmicb.2016.01174
- Escudie, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., . . . Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287-1294. doi:10.1093/bioinformatics/btx791
- Espinoza, J. R., Maco, V., Marcos, L., Saez, S., Neyra, V., Terashima, A., . . . Mas-Coma, S. (2007). Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg*, 76(5), 977-982.
- Esteban, J.-G., Flores, A., Angles, R., & Mas-Coma, S. (1999). High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(2), 151-156. doi:10.1016/s0035-9203(99)90289-4
- Esteban, J. G., Gonzalez, C., Bargues, M. D., Angles, R., Sanchez, C., Naquira, C., & Mas-Coma, S. (2002). High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Trop Med Int Health*, 7(4), 339-348. doi:10.1046/j.1365-3156.2002.00870.x
- Euzet, L., & Combes, C. (1980). Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. *Mémoires de la Société Zoologique de France*.
- Fabian, D., & Flatt, T. (2012). Life History Evolution. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 24.
- Facon, B., & David, P. (2006). Metapopulation dynamics and biological invasions: a spatially explicit model applied to a freshwater snail. *Am Nat*, 168(6), 769-783. doi:10.1086/508669
- FAO. (2020). *Global Forest Resources Assessment 2020 – Key findings*. Retrieved from <https://doi.org/10.4060/ca8753en>

- Fedor, P., & Zvaríková, M. (2019). Biodiversity Indices. In B. Fath (Ed.), *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)* (pp. 337-346). Oxford: Elsevier.
- Fenwick, A., & Jourdan, P. (2016). Schistosomiasis elimination by 2020 or 2030? *Int J Parasitol*, 46(7), 385-388. doi:10.1016/j.ijpara.2016.01.004
- Ficetola, G. F., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessiere, J., . . . Pompanon, F. (2010). An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11, 434. doi:10.1186/1471-2164-11-434
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett*, 4(4), 423-425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118
- Ficetola, G. F., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Mol Ecol Resour*, 16(3), 604-607. doi:10.1111/1755-0998.12508
- Findlay, R., & O'Rourke, K. H. (2007). *Power and Plenty Trade, War, and the World Economy in the Second Millennium*: Princeton University Press.
- Fleming, J. R. (1999). Joseph Fourier, the 'greenhouse effect', and the quest for a universal theory of terrestrial temperatures. *Endeavour*, 23(2), 72-75. doi:10.1016/s0160-9327(99)01210-7
- Fornillos, R. J. C., Sato, M. O., Tabios, I. K. B., Sato, M., Leonardo, L. R., Chigusa, Y., . . . Fontanilla, I. K. C. (2019). Detection of *Schistosoma japonicum* and *Oncomelania hupensis* quadrasi environmental DNA and its potential utility to schistosomiasis japonica surveillance in the Philippines. *PLoS One*, 14(11), e0224617. doi:10.1371/journal.pone.0224617
- Fox, C. W., & Messina, F. J. (2013). Life History. *Oxford Bibliographies*. doi:10.1093/obo/9780199830060-0016
- Fürst, T., Keiser, J., & Utzinger, J. (2012). Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(3), 210-221. doi:10.1016/s1473-3099(11)70294-8
- Gasser, R. B. (2006). Molecular tools--advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*, 136(2), 69-89. doi:10.1016/j.vetpar.2005.12.002
- Gazzinelli, A., & Kloss, H. (2007). The use of spatial tools in the study of *Schistosoma mansoni* and its intermediate host snails in Brazil: a brief review. *Geospat Health*, 2(1), 51-58. doi:10.4081/gh.2007.254
- Gérard, C., Blanc, A., & Costil, K. (2003). *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca:Hydrobiidae) in continental aquatic gastropod communities: impact of salinity and trematode parasitism. *Hydrobiologia*, 493(1), 167-172. doi:10.1023/A:1025443910836

- Giller, P. S., & Malmqvist, B. (1998). *The Biology of Streams and Rivers*. Oxford: Oxford University Press.
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., & Field, K. G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345(6270), 60-63. doi:10.1038/345060a0
- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32(3), 792-800. doi:10.1899/13-046.1
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., . . . Gilbert, M. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299-1307. doi:10.1111/2041-210x.12595
- Gomes, L. I., Dos Santos Marques, L. H., Enk, M. J., de Oliveira, M. C., Coelho, P. M., & Rabello, A. (2010). Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(4), e664. doi:10.1371/journal.pntd.0000664
- Gomes, L. I., Marques, L. H., Enk, M. J., Coelho, P. M., & Rabello, A. (2009). Further evaluation of an updated PCR assay for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human stool samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(8), 1194-1196.
- Gould, E. A., Gallian, P., De Lamballerie, X., & Charrel, R. N. (2010). First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect*, 16(12), 1702-1704. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03386.x
- Gould, S. J., & Vrba, E. S. (1982). Exaptation-a missing term in the science of form. *Paleobiology*, 8(1), 4-15.
- Gyles, C. (2008). Veterinary medicine and public health. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 49(12), 1163-1164.
- Haile, J., Holdaway, R., Oliver, K., Bunce, M., Gilbert, M. T., Nielsen, R., . . . Willerslev, E. (2007). Ancient DNA chronology within sediment deposits: are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? *Mol Biol Evol*, 24(4), 982-989. doi:10.1093/molbev/msm016
- Halstead, N. T., Hoover, C. M., Arakala, A., Civitello, D. J., De Leo, G. A., Gambhir, M., . . . Rohr, J. R. (2018). Agrochemicals increase risk of human schistosomiasis by supporting higher densities of intermediate hosts. *Nat Commun*, 9(1), 837. doi:10.1038/s41467-018-03189-w
- Hamburger, J., He, N., Abbasi, I., Ramzy, R. M., Jourdane, J., & Ruppel, A. (2001). Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water. *Am J Trop Med Hyg*, 65(6), 907-911.

- Hamburger, J., Hoffman, O., Kariuki, H. C., Muchiri, E. M., Ouma, J. H., Koech, D. K., . . . King, C. H. (2004). 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*, 71(6), 765-773.
- Hamburger, J., Turetski, T., Kapeller, I., & Deresiewicz, R. (1991). Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol Biochem Parasitol*, 44(1), 73-80.
- Hamburger, J., Xu, Y. X., Ramzy, R. M., Jourdane, J., & Ruppel, A. (1998). Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am J Trop Med Hyg*, 59(3), 468-473.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 5(10), R245-249. doi:10.1016/s1074-5521(98)90108-9
- Hanelt, B., Adema, C. M., Mansour, M. H., & Loker, E. S. (1997). Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* Using Nested PCR. *The Journal of Parasitology*, 83(3), 387-394. doi:10.2307/3284399
- Hanfling, B., Lawson Handley, L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., . . . Winfield, I. J. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol Ecol*, 25(13), 3101-3119. doi:10.1111/mec.13660
- Hartmann, D. L., Klein Tank, A. M. G., Rusticucci, M., Alexander, L. V., Brönnimann, S., Abdul-Rahman Charabi, Y., . . . Zhai, P. (2013). *Observations: atmosphere and surface*. Retrieved from Cambridge: <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/observations-atmosphere-and-surface/>
- Hashizume, H., Sato, M., Sato, M. O., Ikeda, S., Yoonuan, T., Sanguankiat, S., . . . Minamoto, T. (2017). Application of environmental DNA analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in water samples. *Acta Trop*, 169, 1-7. doi:10.1016/j.actatropica.2017.01.008
- Hay, S. I., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., . . . Murray, C. J. L. (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. *Lancet*, 390(10100), 1260-1344. doi:10.1016/s0140-6736(17)32130-x
- Hill, W. R., & Griffiths, N. A. (2017). Nitrogen processing by grazers in a headwater stream: riparian connections. *Freshwater Biology*, 62(1), 17-29. doi:10.1111/fwb.12833
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., . . . Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 83(22), 8604-8610. doi:10.1021/ac202028g

- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., & Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS One*, 12(6), e0179251. doi:10.1371/journal.pone.0179251
- Holmes, E. C., Rambaut, A., & Andersen, K. G. (2018). Pandemics: spend on surveillance, not prediction. *Nature*(558), 180-182. doi:http://dx.doi.org/10.1038/d41586-01805373-w
- Holtfreter, M. C., Mone, H., Muller-Stover, I., Mouahid, G., & Richter, J. (2014). *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Euro Surveill*, 19(22), 2-4. doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.22.20821
- Hoover, C. M., Rumschlag, S. L., Strgar, L., Arakala, A., Gambhir, M., de Leo, G. A., . . . Remais, J. V. (2020). Effects of agrochemical pollution on schistosomiasis transmission: a systematic review and modelling analysis. *The Lancet Planetary Health*, 4(7), e280-e291. doi:10.1016/s2542-5196(20)30105-4
- Hopkin, M. (2007). Climate change 2007: climate sceptics switch focus to economics. *Nature*, 445(7128), 582-583. doi:10.1038/445582a
- Horak, P., Mikes, L., Lichtenbergova, L., Skala, V., Soldanova, M., & Brant, S. V. (2015). Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clin Microbiol Rev*, 28(1), 165-190. doi:10.1128/CMR.00043-14
- Hotez, P. J., Alvarado, M., Basanez, M. G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., . . . Naghavi, M. (2014). The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e2865. doi:10.1371/journal.pntd.0002865
- Hotez, P. J., Fenwick, A., Ray, S. E., Hay, S. I., & Molyneux, D. H. (2018). "Rapid impact" 10 years after: The first "decade" (2006-2016) of integrated neglected tropical disease control. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(5), e0006137. doi:10.1371/journal.pntd.0006137
- Hotez, P. J., Fenwick, A., Savioli, L., & Molyneux, D. (2009). Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet*, 373, 1570-1575. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60233-6
- Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S. E., Sachs, J. D., & Savioli, L. (2007). Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*, 357(10), 1018-1027. doi:10.1056/NEJMra064142
- Hufbauer, R. A., Facon, B., Ravigne, V., Turgeon, J., Foucaud, J., Lee, C. E., . . . Estoup, A. (2012). Anthropogenically induced adaptation to invade (AIAI): contemporary adaptation to human-altered habitats within the native range can promote invasions. *Evol Appl*, 5(1), 89-101. doi:10.1111/j.1752-4571.2011.00211.x
- Hulme, P. E. (2009). Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 10-18. doi:10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x



- Hung, N. M., Duc, N. V., Stauffer, J. R., Jr., & Madsen, H. (2013). Use of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) in biological control of intermediate host snails of fish-borne zoonotic trematodes in nursery ponds in the Red River Delta, Vietnam. *Parasit Vectors*, 6, 142. doi:10.1186/1756-3305-6-142
- Ibironke, O. A., Phillips, A. E., Garba, A., Lamine, S. M., & Shiff, C. (2011). Diagnosis of *Schistosoma haematobium* by detection of specific DNA fragments from filtered urine samples. *Am J Trop Med Hyg*, 84(6), 998-1001. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0691
- IDT-DNA. (2020). Oligo Analyzer. Retrieved from <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
- Inobaya, M. T., Olveda, R. M., Chau, T. N., Olveda, D. U., & Ross, A. G. (2014). Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. *Res Rep Trop Med*, 2014(5), 65-75. doi:10.2147/RRTM.S44274
- InstituteOfMedicine. (2008). *Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections: Workshop Summary*. Washington, DC: The National Academies Press.
- IPCC. (1990). *Climate Change, The IPCC Scientific Assessment* (J. T. Houghton, G. J. Jenkins, & J. J. Ephraums Eds. Vol. 1). Cambridge: Cambridge University Press.
- IPCC. (2019a). IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse gas fluxes in Terrestrial Ecosystems: Summary for Policymakers. *IPCC SRCCL*, 1-43.
- IPCC. (2019b). IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate: Summary for Policymakers. *IPCC SRCCL*, 1-36.
- IUCN. (2020). International Union for Conservation of Nature. Retrieved from [www.iucn.org](http://www.iucn.org)
- Jannotti-Passos, L. K., Vidigal, T. H. D. A., Dias-Neto, E., Pena, S. D. J., Simpson, A. J. G., Dutra, W. O., . . . Carvalho-Parra, J. F. (1997). PCR Amplification of the Mitochondrial DNA Minisatellite Region to Detect *Schistosoma mansoni* Infection in *Biomphalaria glabrata* Snails. *The Journal of Parasitology*, 83(3), 395-399. doi:10.2307/3284400
- Janssen, J. A. M., Rodwell, J. S., Garcia-Criado, S., Gubbay, S., Haynes, T., Nieto, A., . . . Valachovič, M. (2016). European Red List of Habitats Part 2. Terrestrial and freshwater habitats. *European Publications Office*, 2. doi:10.2779/091372
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., & Minamoto, T. (2019). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecol Evol*, 9(3), 1135-1146. doi:10.1002/ece3.4802
- Johnson, P. D., Bogan, A. E., Brown, K. M., Burkhead, N. M., Cordeiro, J. R., Garner, J. T., . . . Strong, E. E. (2013). Conservation status of freshwater gastropods of Canada and the United States. *Fisheries*, 38(6), 247-282.
- Johnson, P. T., Dobson, A., Lafferty, K. D., Marcogliese, D. J., Memmott, J., Orlofske, S. A., . . . Thieltges, D. W. (2010). When parasites become prey: ecological and epidemiological

- significance of eating parasites. *Trends Ecol Evol*, 25(6), 362-371. doi:10.1016/j.tree.2010.01.005
- Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M. (1997). Positive and Negative Effects of Organisms as Physical Ecosystem Engineers. *Ecology*, 78(7). doi:10.1890/0012-9658(1997)078[1946:Paneoo]2.0.Co;2
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993. doi:10.1038/nature06536
- Jones, R. A., Brophy, P. M., Davis, C. N., Davies, T. E., Emberson, H., Rees Stevens, P., & Williams, H. W. (2018). Detection of *Galba truncatula*, *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* environmental DNA within water sources on pasture land, a future tool for fluke control? *Parasit Vectors*, 11(1), 342. doi:10.1186/s13071-018-2928-z
- Kalinda, C., Chimbari, M., & Mukaratirwa, S. (2017). Implications of Changing Temperatures on the Growth, Fecundity and Survival of Intermediate Host Snails of Schistosomiasis: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*, 14(1). doi:10.3390/ijerph14010080
- Keesing, F., Belden, L. K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C. D., Holt, R. D., . . . Ostfeld, R. S. (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468(7324), 647-652. doi:10.1038/nature09575
- Keiser, J., & Utzinger, J. (2009). Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev*, 22(3), 466-483. doi:10.1128/CMR.00012-09
- Kim, K. H., Kabir, E., & Ara Jahan, S. (2014). A review of the consequences of global climate change on human health. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 32(3), 299-318. doi:10.1080/10590501.2014.941279
- Kincaid-Smith, J., Rey, O., Toulza, E., Berry, A., & Boissier, J. (2017). Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. *Trends Parasitol*, 33(8), 600-609. doi:10.1016/j.pt.2017.04.009
- Kincaid Smith, J. (2018). *Life history traits modification during hybridization and underlying molecular mechanisms in platyhelminthes parasites of the genus Schistosoma*. Université de Perpignan, Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01957582> (2018PERP0028)
- King, C. H., Sturrock, R. F., Kariuki, H. C., & Hamburger, J. (2006). Transmission control for schistosomiasis - why it matters now. *Trends Parasitol*, 22(12), 575-582. doi:10.1016/j.pt.2006.09.006
- King, K. C., Stelkens, R. B., Webster, J. P., Smith, D. F., & Brockhurst, M. A. (2015). Hybridization in Parasites: Consequences for Adaptive Evolution, Pathogenesis, and Public Health in a Changing World. *PLoS Pathog*, 11(9), e1005098. doi:10.1371/journal.ppat.1005098

- Klymus, K. E., Marshall, N. T., & Stepien, C. A. (2017). Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. *PLoS One*, 12(5), e0177643. doi:10.1371/journal.pone.0177643
- Knubben-Schweizer, G., Ruegg, S., Torgerson, P. R., Rapsch, C., Grimm, F., Hassig, M., . . . Braun, U. (2010). Control of bovine fasciolosis in dairy cattle in Switzerland with emphasis on pasture management. *Vet J*, 186(2), 188-191. doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.003
- Kozioł, A., Stat, M., Simpson, T., Jarman, S., DiBattista, J. D., Harvey, E. S., . . . Bunce, M. (2018). Environmental DNA metabarcoding studies are critically affected by substrate selection. *Mol Ecol Resour*. doi:10.1111/1755-0998.12971
- Krol, L., Van der Hoorn, B., Gorsich, E. E., Trimbos, K., Bodegom, P. M. v., & Schrama, M. (2019). How Does eDNA Compare to Traditional Trapping? Detecting Mosquito Communities in South-African Freshwater Ponds. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. doi:10.3389/fevo.2019.00260
- Kwenti, T. E. (2017). Biological Control of Parasites. In H. K. M. G. & G. B. (Eds.), *Natural Remedies in the Fight Against Parasites*: IntechOpen.
- Lafferty, K. D. & Kuris, A. M. (2002). Trophic strategies, animal diversity and body size. *Trends in Evolution*, 17(11), 507-513.
- Laidemitt, M. R., Anderson, L. C., Wearing, H. J., Mutuku, M. W., Mkoji, G. M., & Loker, E. S. (2019). Antagonism between parasites within snail hosts impacts the transmission of human schistosomiasis. *eLife*, 8. doi:10.7554/eLife.50095
- Lamy, T., Pointier, J. P., Jarne, P., & David, P. (2012). Testing metapopulation dynamics using genetic, demographic and ecological data. *Mol Ecol*, 21(6), 1394-1410. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05478.x
- Lee, K. (2004). Globalisation: what is it and how does it affect health? *Medical Journal of Australia*, 180(4), 156-158. doi:10.5694/j.1326-5377.2004.tb05855.x
- Lee, R. (2003). The Demographic Transition: Three Centuries of Fundamental Change. *Journal of Economic Perspectives*, 17(4), 167-190. doi:10.1257/089533003772034943
- Legresy, B. (2014). Sea Level. Retrieved from <https://research.csiro.au/slrwavescoast/sea-level/>
- Lier, T., Simonsen, G. S., Wang, T., Lu, D., Haukland, H. H., Vennervald, B. J., . . . Johansen, M. V. (2009). Real-time polymerase chain reaction for detection of low-intensity *Schistosoma japonicum* infections in China. *Am J Trop Med Hyg*, 81(3), 428-432.
- Lingscheid, T., Witzenthath, M., Bouchaud, O., Kern, P., Saraiva da Cunha, J., Beltrame, A., . . . Björkman, A. (2017). Schistosomiasis in European Travelers and Migrants: Analysis of 14 Years TropNet Surveillance Data. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(2), 567-574. doi:10.4269/ajtmh.17-0034

- Lodge, D. M., Stein, R. A., Brown, K. M., Covich, A. P., Bronmark, C., Garvey, J. E., & Klosiewski, S. P. (1998). Predicting impact of freshwater exotic species on native biodiversity: Challenges in spatial scaling. *Austral Ecology*, 23(1), 53-67. doi:10.1111/j.1442-9993.1998.tb00705.x
- Logan, J., Logan, J. M. J., Edwards, K. J., & Saunders, N. A. (2009). *Real-time PCR: Current Technology and Applications*: Caister Academic Press.
- Loker, E. S., Moyo, H. G., & Gardner, S. L. (1981). Trematode–gastropod associations in nine non-lacustrine habitats in the Mwanza region of Tanzania. *Parasitology*, 83(2), 381-399. doi:10.1017/s0031182000085383
- Loo, S. E., Keller, R. P., & Leung, B. (2007). Freshwater invasions: using historical data to analyse spread. *Diversity and Distributions*, 13(1), 23-32. doi:10.1111/j.1366-9516.2006.00313.x
- Lowry, E., Rollinson, E. J., Laybourn, A. J., Scott, T. E., Aiello-Lammens, M. E., Gray, S. M., . . . Gurevitch, J. (2012). Biological invasions: a field synopsis, systematic review, and database of the literature. *Ecol Evol*, 3(1), 182-196. doi:10.1002/ece3.431
- Lu, X. T., Gu, Q. Y., Limpanont, Y., Song, L. G., Wu, Z. D., Okanurak, K., & Lv, Z. Y. (2018). Snail-borne parasitic diseases: an update on global epidemiological distribution, transmission interruption and control methods. *Infect Dis Poverty*, 7(1), 28. doi:10.1186/s40249-018-0414-7
- Luikart, G., Ryman, N., Tallmon, D. A., Schwartz, M. K., & Allendorf, F. W. (2010). Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics*, 11(2), 355-373. doi:10.1007/s10592-010-0050-7
- Lydeard, C., Cowie, R. H., Ponder, W. F., Bogan, A. E., Bouchet, P., Clark, S. A., . . . Thompson, F. G. (2004). The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, 54(4), 321-330.
- Machler, E., Osathanunkul, M., & Altermatt, F. (2018). Shedding light on eDNA: neither natural levels of UV radiation nor the presence of a filter feeder affect eDNA-based detection of aquatic organisms. *PLoS One*, 13(4), e0195529. doi:10.1371/journal.pone.0195529
- Mackenbach, J. P. (2007). Global environmental change and human health: a public health research agenda. *J Epidemiol Community Health*, 61(2), 92-94. doi:10.1136/jech.2005.045211
- Malek, E. A. (1980). *Snail-transmitted parasitic diseases* (Vol. 1): CRC Press, Inc.
- Malone, J. B., Bergquist, R., Martins, M., & Luvall, J. C. (2019). Use of Geospatial Surveillance and Response Systems for Vector-Borne Diseases in the Elimination Phase. *Trop Med Infect Dis*, 4(1). doi:10.3390/tropicalmed4010015
- Martins, A. V. (1958). Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. *Bulletin of the World Health Organization*, 18(5-6), 931-944.

- Martins, F. M. S., Porto, M., Feio, M. J., Egeter, B., Bonin, A., Serra, S. R. Q., . . . Beja, P. (2020). Modelling technical and biological biases in macroinvertebrate community assessment from bulk preservative using multiple metabarcoding markers. *Mol Ecol*. doi:10.1111/mec.15620
- Mauvisseau, Q., Burian, A., Gibson, C., Brys, R., Ramsey, A., & Sweet, M. (2019). Influence of accuracy, repeatability and detection probability in the reliability of species-specific eDNA based approaches. *Sci Rep*, 9(1), 580. doi:10.1038/s41598-018-37001-y
- McCreesh, N., & Booth, M. (2014). The effect of simulating different intermediate host snail species on the link between water temperature and schistosomiasis risk. *PLoS One*, 9(7), e87892. doi:10.1371/journal.pone.0087892
- Meadows, D., Meadows, D., Randers, J., & Behrens, W. W. I. (1972). *The Limits to Growth*: Potomac Associates - Universe Books.
- Melo, F. L., Gomes, A. L., Barbosa, C. S., Werkhauser, R. P., & Abath, F. G. (2006). Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100(11), 1049-1055. doi:10.1016/j.trstmh.2005.12.008
- Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Bousses, S., Durand, P., Bargues, M. D., Mas-Coma, S., . . . Renaud, F. (2001). Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Mol Ecol*, 10(5), 1333-1340. doi:10.1046/j.1365-294x.2001.01284.x
- Mideo, N., & Reece, S. E. (2012). Plasticity in parasite phenotypes: evolutionary and ecological implications for disease. *Future Microbiol*, 7(1), 17-24. doi:10.2217/fmb.11.134
- Miralles, L., Parrondo, M., Hernandez de Rojas, A., Garcia-Vazquez, E., & Borrell, Y. J. (2019). Development and validation of eDNA markers for the detection of *Crepidula fornicata* in environmental samples. *Mar Pollut Bull*, 146, 827-830. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.07.050
- Mironova, E., Gopko, M., Pasternak, A., Mikheev, V., & Taskinen, J. (2019). Trematode cercariae as prey for zooplankton: effect on fitness traits of predators. *Parasitology*, 146(1), 105-111. doi:10.1017/S0031182018000963
- Molina, M., & Rowland, F. S. (1974). Stratospheric sink for chlorofluorocarbons: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature*, 249(5460), 810-812.
- Mone, H., Holtfreter, M. C., Allienne, J. F., Mints-Nguema, R., Ibikounle, M., Boissier, J., . . . Mouahid, G. (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(11), 4127-4133. doi:10.1007/s00436-015-4643-4
- Mone, H., Holtfreter, M. C., Mouahid, G., & Richter, J. (2016). Difficulties in Schistosomiasis Assessment, Corsica, France. *Emerg Infect Dis*, 22(4), 762-763. doi:10.3201/eid2204.160110



- Morand, S. (2011). Infectious Diseases, Biodiversity and Global Changes: How the Biodiversity Sciences May Help. In J. López-Pujol (Ed.), *The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity* (pp. 390): InTech.
- Morand, S. (2020). Emerging diseases, livestock expansion and biodiversity loss are positively related at global scale. *Biological Conservation*, 248. doi:10.1016/j.biocon.2020.108707
- Morse, S. S. (1995). Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis*, 1(1), 7-15. doi:10.3201/eid0101.950102
- Morse, S. S., Mazet, J. A. K., Woolhouse, M. E., Parrish, C. R., Carroll, D., Karesh, W. B., . . . Daszak, P. (2012). Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *The Lancet*, 380(9857), 1956-1965. doi:10.1016/s0140-6736(12)61684-5
- Mulero, S., Boissier, J., Allienne, J., Quilichini, Y., Foata, J., Pointier, J., & Rey, O. (2020). Environmental DNA for detecting *Bulinus truncatus*: A new environmental surveillance tool for schistosomiasis emergence risk assessment. *Environmental DNA*, 2(2), 161-174. doi:10.1002/edn3.53
- Mulero, S., Rey, O., Arancibia, N., Mas-Coma, S., & Boissier, J. (2019). Persistent establishment of a tropical disease in Europe: the preadaptation of schistosomes to overwinter. *Parasit Vectors*, 12(1), 379. doi:10.1186/s13071-019-3635-0
- Mulero, S., Toulza, E., Loisier, A., Zimmerman, M., Allienne, J. F., Foata, J., . . . Boissier, J. (2020). Malacological survey in a bottle of water: A comparative study between manual sampling and environmental DNA metabarcoding approaches. *GECCO*, e01428(25). doi: 10.1016/j.gecco.2020.e01428
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-350. doi:10.1016/0076-6879(87)55023-6
- NASA. (2020). Satellite sea level observations. Retrieved from <https://climate.nasa.gov/vital-signs/sea-level/>
- Nathan, L. M., Simmons, M., Wegleitner, B. J., Jerde, C. L., & Mahon, A. R. (2014). Quantifying environmental DNA signals for aquatic invasive species across multiple detection platforms. *Environ Sci Technol*, 48(21), 12800-12806. doi:10.1021/es5034052
- NCBI. (2020). <ftp.ncbi.nlm.nih.gov>. Retrieved from <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/taxonomy/>
- Nichols, R. V., Curd, E., Heintzman, P. D., & Shapiro, B. (2019). Targeted Amplification and Sequencing of Ancient Environmental and Sedimentary DNA. *Methods Mol Biol*, 1963, 149-161. doi:10.1007/978-1-4939-9176-1\_16
- Noel, H., Ruello, M., Maccary, A., Pelat, C., Sommen, C., Boissier, J., . . . Berry, A. (2018). Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France:

- monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect*, 24(3), 295-300. doi:10.1016/j.cmi.2017.06.026
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12), E63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
- Ogden, N. H., Wilson, J. R. U., Richardson, D. M., Hui, C., Davies, S. J., Kumschick, S., . . . Pulliam, J. R. C. (2019). Emerging infectious diseases and biological invasions: a call for a One Health collaboration in science and management. *R Soc Open Sci*, 6(3), 181577. doi:10.1098/rsos.181577
- Ogram G.S, B. T. A. S. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7, 9-9.
- OHITF. (2008). *One Health : A New Professional Imperative*. Retrieved from [https://www.avma.org/sites/default/files/resources/onehealth\\_final.pdf](https://www.avma.org/sites/default/files/resources/onehealth_final.pdf)
- Oleaga, A., Ramajo-Hernandez, A., Perez-Sanchez, R., & Ramajo-Martin, V. (2004). Prevalence and distribution of the bullfighting cattle farms infected with *Schistosoma bovis* in the province of Salamanca (Spain). In S. Mas-Coma (Ed.), *Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases* (pp. 283-284). Valencia: Artes graficas Aguilar SL, Valencia.
- Oleaga, A., Rey, O., Polack, B., Grech-Angelini, S., Quilichini, Y., Perez-Sanchez, R., . . . Boissier, J. (2019). Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission? *PLoS Negl Trop Dis*, 13(6), e0007543. doi:10.1371/journal.pntd.0007543
- Olson, P. D., Cribb, T. H., Tkach, V. V., Bray, R. A., & Littlewood, D. T. J. (2003). Phylogeny and classification of the *Digenea* (*Platyhelminthes: Trematoda*) 11 Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers AY222082–AY222285. *International Journal for Parasitology*, 33(7), 733-755. doi:10.1016/s0020-7519(03)00049-3
- Orlofske, S. A., Jadin, R. C., & Johnson, P. T. (2015). It's a predator-eat-parasite world: how characteristics of predator, parasite and environment affect consumption. *Oecologia*, 178(2), 537-547. doi:10.1007/s00442-015-3243-4
- Orman, A. R. (1971). The epidemiologic transition: A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem. Fund Quat.*, 49(4), 355-391.
- Ortiz-Ospina, E., & Beltekian, D. (2014, October 2018). Trade and Globalization. Retrieved from <https://ourworldindata.org/trade-and-globalization>
- Panagiotopoulos, T. (2018). Screening for infectious diseases in newly arrived migrants in Europe: the context matters. *Euro Surveill*, 23(28). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.28.1800283

- Pandey, B., Agrawal, M., & Singh, S. (2014). Assessment of air pollution around coal mining area: Emphasizing on spatial distributions, seasonal variations and heavy metals, using cluster and principal component analysis. *Atmospheric Pollution Research*, 5(1), 79-86. doi:10.5094/apr.2014.010
- Parmesan, C., & Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421(6918), 37-42. doi:10.1038/nature01286
- Pech-May, A., Moo-Llanes, D. A., Puerto-Avila, M. B., Casas, M., Danis-Lozano, R., Ponce, G., . . . Ramsey, J. M. (2016). Population genetics and ecological niche of invasive *Aedes albopictus* in Mexico. *Acta Trop*, 157, 30-41. doi:10.1016/j.actatropica.2016.01.021
- Pedersen, M. W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Sarkissian, C. D., Haile, J., Hellstrom, M., . . . Willerslev, E. (2015). Ancient and modern environmental DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1660), 20130383. doi:10.1098/rstb.2013.0383
- Pedersen, U. B., Stendel, M., Midzi, N., Mduluzi, T., Soko, W., Stensgaard, A. S., . . . Kristensen, T. K. (2014). Modelling climate change impact on the spatial distribution of fresh water snails hosting trematodes in Zimbabwe. *Parasit Vectors*, 7, 536. doi:10.1186/s13071-014-0536-0
- Penck, A., & Brückner, E. (1909). *Die Alpen im Eiszeitalter*. Universität du Michigan: C. H. Tauchnitz.
- Pereira, H. M., Leadley, P. W., Proenca, V., Alkemade, R., Scharlemann, J. P., Fernandez-Manjarres, J. F., . . . Walpole, M. (2010). Scenarios for global biodiversity in the 21st century. *Science*, 330(6010), 1496-1501. doi:10.1126/science.1196624
- Perez-Saez, J., Mari, L., Bertuzzo, E., Casagrandi, R., Sokolow, S. H., De Leo, G. A., . . . Rinaldo, A. (2015). A Theoretical Analysis of the Geography of Schistosomiasis in Burkina Faso Highlights the Roles of Human Mobility and Water Resources Development in Disease Transmission. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(10), e0004127. doi:10.1371/journal.pntd.0004127
- Perkins Marsh, G. (1864). *Man and nature ; or, physical geography as modified by human action* (Vol. 1). New York: Baird Corr., Smithsonian Institution.
- Perkins Marsh, G. (2008). L'homme et la nature ; ou, la géographie physique modifiée par l'action humaine. ["Man and Nature; or, Physical Geography Modified by Human Action"]. 35(1), 155-176. doi:10.3917/ecopo.035.0155
- Peters, L., Spatharis, S., Dario, M. A., Dwyer, T., Roca, I. J. T., Kintner, A., . . . Praebel, K. (2018). Environmental DNA: A New Low-Cost Monitoring Tool for Pathogens in Salmonid Aquaculture. *Front Microbiol*, 9, 3009. doi:10.3389/fmicb.2018.03009
- Pflüger, W., Roushdy, M. Z., & el-Emam, M. (1984). The prepatent period and cercarial production of *Schistosoma haematobium* in *Bulinus truncatus* (Egyptian field strains) at different constant temperatures. *Z Parasitenkd*, 70, 95-103.

- Picheral, H. (1996). La transition sanitaire dans le monde (World health transition). *Bulletin de l'Association de géographes français*, 73(2), 75-85. doi:10.3406/bagf.1996.1886
- Pointier, J.-P. (2015). *Freshwater Molluscs of Venezuela and their Medical and Veterinary Importance* (ConchBooks Ed.). France: ConchBooks.
- Pointier, J.-P., David, P., & Jarne, P. (2010). The Biological Control of the Snail Hosts of Schistosomes: The Role of Competitor Snails and Biological Invasions. In T. R. & B. Fried (Eds.), (pp. 215-238). New York, NY: Springer, New York, NY.
- Pointier, J. P., Coustau, C., Rondelaud, D., & Theron, A. (2007). *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (*Gastropoda, Lymnaeidae*), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitol Res*, 101(5), 1389-1392. doi:10.1007/s00436-007-0656-y
- Pointier, J. P., & David, P. (2004). Biological control of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of schistosomes, by *Marisa cornuarietis* in ponds of Guadeloupe: long-term impact on the local snail fauna and aquatic flora. *Biological Control*, 29(1), 81-89. doi:10.1016/s1049-9644(03)00137-3
- Pointier, J. P., David, P., & Jarne, P. (2005). Biological invasions: the case of planorbid snails. *Journal of Helminthology*, 79(3), 249-256. doi:10.1079/JOH2005292
- Ponder, W. F. (1988). *Potamopyrgus Antipodarum*—a Molluscan Coloniser of Europe and Australia. *Journal of Molluscan Studies*, 54(3), 271-285. doi:10.1093/mollus/54.3.271
- Pontes, L. A., Oliveira, M. C., Katz, N., Dias-Neto, E., & Rabello, A. (2003). Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*, 68(6), 652-656.
- Portet, A., Pinaud, S., Chaparro, C., Galinier, R., Dheilly, N. M., Portela, J., . . . Gourbal, B. (2019). Sympatric versus allopatric evolutionary contexts shape differential immune response in *Biomphalaria* / *Schistosoma* interaction. *PLoS Pathog*, 15(3), e1007647. doi:10.1371/journal.ppat.1007647
- Prié, V., Soler, J., Araujo, R., Cucherat, X., Philippe, L., Patry, N., . . . Wantzen, K. M. (2017). Challenging exploration of troubled waters: a decade of surveys of the giant freshwater pearl mussel *Margaritifera auricularia* in Europe. *Hydrobiologia*, 810(1), 157-175. doi:10.1007/s10750-017-3456-0
- Prié, V., Valentini, A., Lopes-Lima, M., Froufe, E., Rocle, M., Poulet, N., . . . Dejean, T. (2020). Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*. doi:10.1007/s10750-020-04260-8
- Pulido-Murillo, E. A., Furtado, L. F. V., Melo, A. L., Rabelo, E. M. L., & Pinto, H. A. (2018). Fishborne Zoonotic Trematodes Transmitted by *Melanoides tuberculata* Snails, Peru. *Emerg Infect Dis*, 24(3), 606-608. doi:10.3201/eid2403.172056

- Puth, L. M., & Post, D. M. (2005). Studying invasion: have we missed the boat? *Ecology Letters*, 8(7), 715-721. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00774.x
- Rahmstorf, S., & Coumou, D. (2011). Increase of extreme events in a warming world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1101766108
- Ramalli, L., Mulero, S., Noel, H., Chiappini, J. D., Vincent, J., Barre-Cardi, H., . . . Berry, A. (2018). Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in southern Corsica since 2013. *Euro Surveill*, 23(4), 2-5. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017
- Rands, M. R., Adams, W. M., Bennun, L., Butchart, S. H., Clements, A., Coomes, D., . . . Vira, B. (2010). Biodiversity conservation: challenges beyond 2010. *Science*, 329(5997), 1298-1303. doi:10.1126/science.1189138
- Rathinasamy, V., Hosking, C., Tran, L., Kelley, J., Williamson, G., Swan, J., . . . Spithill, T. W. (2018). Development of a multiplex quantitative PCR assay for detection and quantification of DNA from *Fasciola hepatica* and the intermediate snail host, *Austropeplea tomentosa*, in water samples. *Vet Parasitol*, 259, 17-24. doi:10.1016/j.vetpar.2018.06.018
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes*, 7(3), 355-364. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- Rees, H. C., Gough, K. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Maddison, B. C., & Crispo, E. (2015). Applications and limitations of measuring environmental DNA as indicators of the presence of aquatic animals. *Journal of Applied Ecology*, 52(4), 827-831. doi:10.1111/1365-2664.12467
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., . . . Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. 94(3), 849-873. doi:10.1111/brv.12480
- Renshaw, M. A., Olds, B. P., Jerde, C. L., McVeigh, M. M., & Lodge, D. M. (2015). The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Mol Ecol Resour*, 15(1), 168-176. doi:10.1111/1755-0998.12281
- Rey, A., Carney, K. J., Quinones, L. E., Pagenkopp Lohan, K. M., Ruiz, G. M., Basurko, O. C., & Rodriguez-Ezpeleta, N. (2019). Environmental DNA Metabarcoding: A Promising Tool for Ballast Water Monitoring. *Environ Sci Technol*, 53(20), 11849-11859. doi:10.1021/acs.est.9b01855
- Riaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P., & Coissac, E. (2011). ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res*, 39(21), e145. doi:10.1093/nar/gkr732



- Richards, S. L., Lord, C. C., Pesko, K., & Tabachnick, W. J. (2009). Environmental and biological factors influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) vector competence for Saint Louis encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg*, 81(2), 264-272.
- Ridley, M. (2009). *Evolution, 3rd Edition* (3 ed.): Wiley-Blackwell.
- Rigaud, K. K., de Sherbinin, A., Jones, B., Bergmann, J., Clement, V., Ober, K., . . . Midgley, A. (2018). *Groundswell : Preparing for Internal Climate Migration*. Retrieved from Washington, DC. © World Bank: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/29461>
- Ritchie, H., & Roser, M. (2017). CO<sub>2</sub> and Greenhouse Gas Emissions. Retrieved from <https://ourworldindata.org/co2-and-other-greenhouse-gas-emissions>
- Ritchie, H., & Roser, M. (2018, 2019). Causes of Death. Retrieved from <https://ourworldindata.org/causes-of-death#what-do-people-die-from>
- Robinson, M. W., & Dalton, J. P. (2009). Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1530), 2763-2776. doi:10.1098/rstb.2009.0089
- Rodriguez-Tapia, L., & Morales-Novelo, J. A. (2017). Bacterial Pollution in River Waters and Gastrointestinal Diseases. *Int J Environ Res Public Health*, 14(5). doi:10.3390/ijerph14050479
- Roffi, J., & Lemasson, J. M. (1981). Utilisation d'un antigène hétérologue (*Schistosoma bovis*) pour le sérodiagnostic immunoenzymatique de la bilharziose urinaire. v. 74.
- Roser, M., Ritchie, H., & Ortiz-Ospina, E. (2013, 2019). World Population Growth. Retrieved from <https://ourworldindata.org/world-population-growth>
- Ross, A. G., Vickers, D., Olds, G. R., Shah, S. M., & McManus, D. P. (2007). Katayama syndrome. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(3), 218-224. doi:10.1016/s1473-3099(07)70053-1
- Rotmans, J., & Vries, B. (1997). *Perspectives on Global Change* (J. Rotmans & B. d. Vries Eds.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Rubaba, O., Chimbari, M. J., & Mukaratirwa, S. (2016). The role of snail aestivation in transmission of schistosomiasis in changing climatic conditions. *African Journal of Aquatic Science*, 41(2), 143-150. doi:10.2989/16085914.2016.1145103
- Rudko, S. P., Turnbull, A., Reimink, R. L., Froelich, K., & Hanington, P. C. (2019). Species-specific qPCR assays allow for high-resolution population assessment of four species avian schistosome that cause swimmer's itch in recreational lakes. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 9, 122-129. doi:10.1016/j.ijppaw.2019.04.006
- Ryan, P. G., Dilley, B. J., Ronconi, R. A., & Connan, M. (2019). Rapid increase in Asian bottles in the South Atlantic Ocean indicates major debris inputs from ships. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(42), 20892. doi:10.1073/pnas.1909816116

- Sabourin, E. (2018). *Fasciola hepatica's dynamic in intensive anthropized system : la Camargue*. Université Montpellier, Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01976817> (2018MONTG047)
- Sabourin, E., Alda, P., Vazquez, A., Hurtrez-Bousses, S., & Vittecoq, M. (2018). Impact of Human Activities on Fasciolosis Transmission. *Trends Parasitol*, 34(10), 891-903. doi:10.1016/j.pt.2018.08.004
- Sandland, G. J., Rodgers, J. K., & Minchella, D. J. (2007). Interspecific antagonism and virulence in hosts exposed to two parasite species. *J Invertebr Pathol*, 96(1), 43-47. doi:10.1016/j.jip.2007.02.005
- Sandoval, N., Siles-Lucas, M., Perez-Arellano, J. L., Carranza, C., Puente, S., Lopez-Aban, J., & Muro, A. (2006). A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. *Parasitology*, 133(Pt 5), 581-587. doi:10.1017/S0031182006000898
- Sato, Y., Mizuyama, M., Sato, M., Minamoto, T., Kimura, R., & Toma, C. (2019). Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic *Leptospira* and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan. *Scientific Reports*, 9(1), 6575. doi:10.1038/s41598-019-42978-1
- Savassi, B., Mouahid, G., Lasica, C., Mahaman, S. K., Garcia, A., Courtin, D., . . . Mone, H. (2020). Cattle as natural host for *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) Weinland, 1858 x *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 interactions, with new cercarial emergence and genetic patterns. *Parasitol Res*, 119(7), 2189-2205. doi:10.1007/s00436-020-06709-0
- Schaffner, F., Bellini, R., Petric, D., Scholte, E. J., Zeller, H., & Rakotoarivony, L. M. (2013). Development of guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. *Parasit Vectors*, 6, 209. doi:10.1186/1756-3305-6-209
- Schets, F. M., Lodder, W. J., van Duynhoven, Y. T., & de Roda Husman, A. M. (2008). Cercarial dermatitis in the Netherlands caused by *Trichobilharzia* spp. *J Water Health*, 6(2), 187-195. doi:10.2166/wh.2008.028
- Schniebs, K., Glöer, P., Quiñonero-Salgado, S., Lopez-Soriano, J., & Hundsdoerfer, A. K. (2018). The first record of *Galba cubensis* (L. Pfeiffer, 1839) (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) from open fields of Europe. *Folia Malacologica*, 26(1), 3-15. doi:10.12657/folmal.026.002
- Schniebs, K., Glöer, P., Vinarski, M. V., Quinonero-Salgado, S., Lopez-Soriano, J., & Hundsdoerfer, A. K. (2017). A new alien species in Europe: First record of *Austropeplea viridis* (Quoy & Gaimard, 1833) (Mollusca, Gastropoda, Lymnaeidae) in Spain. *Journal of Conchology*, 42(5), 357-370.
- Schols, R., Carolus, H., Hammoud, C., Mulero, S., Mudavanhu, A., & Huyse, T. (2019). A rapid diagnostic multiplex PCR approach for xenomonitoring of human and animal schistosomiasis in a 'One Health' context. *Trans R Soc Trop Med Hyg*(67), 1-8. doi:10.1093/trstmh/trz067

- Schwetz, J. (1951). Recherches sur *Schistosoma rodhaini* brumpt 1931 (Première étude). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 26(4), 323-333.
- Selemetas, N., Phelan, P., O'Kiely, P., & de Waal, T. (2015). The effects of farm management practices on liver fluke prevalence and the current internal parasite control measures employed on Irish dairy farms. *Vet Parasitol*, 207(3-4), 228-240. doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.010
- Seymour, M. (2019). Rapid progression and future of environmental DNA research. *Commun Biol*, 2, 80. doi:10.1038/s42003-019-0330-9
- Seymour, M., Durance, I., Cosby, B. J., Ransom-Jones, E., Deiner, K., Ormerod, S. J., . . . Creer, S. (2018). Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Commun Biol*, 1, 4. doi:10.1038/s42003-017-0005-3
- Shapiro, B. (2008). Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA. *Trends Biotechnol*, 26(6), 285-287. doi:10.1016/j.tibtech.2008.03.005
- Simberloff, D. (2014). Biological invasions: What's worth fighting and what can be won? *Ecological Engineering*, 65, 112-121. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.08.004
- Slootweg, R. (1995). Snail control by fish: an explanation for its failure. *Naga*, 18(4), 16-19.
- Smith, K. F., & Guégan, J.-F. (2010). Changing Geographic Distributions of Human Pathogens. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41(1), 231-250. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102209-144634
- Smith, L. (2017). *Biodiversity monitoring using environmental DNA: can it detect all fish species in a waterbody and is it cost effective for routine monitoring?*, Edith Cowan University, Retrieved from <https://ro.ecu.edu.au/theses/1985>
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Mark Welch, D., Huse, S. M., Neal, P. R., . . . Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(32), 12115-12120. doi:10.1073/pnas.0605127103
- Sokolow, S. H., Jones, I. J., Jocque, M., La, D., Cords, O., Knight, A., . . . De Leo, G. A. (2017). Nearly 400 million people are at higher risk of schistosomiasis because dams block the migration of snail-eating river prawns. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372(1722). doi:10.1098/rstb.2016.0127
- Steffen, W., Sanderson, A., Tyson, P. D., Jäger, J., Matson, P. A., Moore, B., . . . Wasson, R. J. (2004). *Global Change and the Earth System: A Planet Under Pressure*: IGBP Secretariat, Royal Swedish Academy of Sciences.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., & Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(7), 411-425. doi:10.1016/s1473-3099(06)70521-7

- Stothard, J. R., Sousa-Figueiredo, J. C., Betson, M., Bustinduy, A., & Reinhard-Rupp, J. (2013). Schistosomiasis in African infants and preschool children: let them now be treated! *Trends Parasitol*, 29(4), 197-205. doi:10.1016/j.pt.2013.02.001
- Strayer, D. L., & Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1), 344-358. doi:10.1899/08-171.1
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.038
- Subhani, F., Nizamuddin, R., Qasim, A., Idrees, N., Ahmed, I., Nizami, S., . . . Beg, M. A. (2014). The emerging threat of schistosomiasis spread in Pakistan. *Trop Biomed*, 31(1), 118-121.
- Susser, M., & Susser, E. (1996). Choosing a future for epidemiology: I. Eras and paradigms. *Am J Public Health*, 86(5), 668-673. doi:10.2105/ajph.86.5.668
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Mol Ecol*, 21(8), 1789-1793. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x
- Tanser, F., Azongo, D. K., Vandormael, A., Barnighausen, T., & Appleton, C. (2018). Impact of the scale-up of piped water on urogenital schistosomiasis infection in rural South Africa. *eLife*, 7. doi:10.7554/eLife.33065
- Tansley, A. G. (1935). The use and abuse of vegetational concepts and terms. *Ecology*, 1(16), 284-307.
- Taylor, H. R., & Harris, W. E. (2012). An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Mol Ecol Resour*, 12(3), 377-388. doi:10.1111/j.1755-0998.2012.03119.x
- Taylor, L. H., Latham, S. M., & Woolhouse, M. E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1411), 983-989. doi:10.1098/rstb.2001.0888
- Taylor, S. C., Laperriere, G., & Germain, H. (2017). Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep*, 7(1), 2409. doi:10.1038/s41598-017-02217-x
- ten Hove, R. J., Verweij, J. J., Vereecken, K., Polman, K., Dieye, L., & van Lieshout, L. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102(2), 179-185. doi:10.1016/j.trstmh.2007.10.011

- Theron, A. (1979a). A differential filtration technique for the measurement of schistosome cercarial densities in standing waters. *Bull World Health Organ*, 57(6), 971-975.
- Theron, A. (1979b). Technique nouvelle pour la mesure des densités cercariennes de schistosomes par filtration différentielle dans les eaux courantes et stagnantes. *Yonsei Reports on Tropical Medicine*, 10(1), 29-36.
- Theron, A. (1986). Cercariometry and the epidemiology of schistosomiasis. *Parasitol Today*, 2(3), 61-63. doi:10.1016/0169-4758(86)90156-0
- Theron, A. (1989). Hybrids between *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini* : characterization by cercarial emergence rhythms. *Parasitology*, 99(02), 225-228. doi:10.1017/s0031182000058674
- Theron, A. (2015). Chronobiology of trematode cercarial emergence: from data recovery to epidemiological, ecological and evolutionary implications. *Adv Parasitol*, 88, 123-164. doi:10.1016/bs.apar.2015.02.003
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T., . . . Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol*, 21(11), 2565-2573. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.019
- Tickner, D., Opperman, J. J., Abell, R., Acreman, M., Arthington, A. H., Bunn, S. E., . . . Young, L. (2020). Bending the Curve of Global Freshwater Biodiversity Loss: An Emergency Recovery Plan. *BioScience*, 70(4), 330-342. doi:10.1093/biosci/biaa002
- Toledo, R., Monteagudo, C., Espert, A., Fried, B., Esteban, J. G., & Marcilla, A. (2006). *Echinostoma caproni*: intestinal pathology in the golden hamster, a highly compatible host, and the Wistar rat, a less compatible host. *Exp Parasitol*, 112(3), 164-171. doi:10.1016/j.exppara.2005.11.003
- Toma, B., & Thiry, E. (2003). Qu'est ce qu'une maladie émergente ? *Epidémiol. et santé anim.*(44), 1-11.
- Tremblay, É. D., Duceppe, M. O., Thurston, G. B., Gagnon, M. C., Côté, M. J., & Bilodeau, G. J. (2019). High-resolution biomonitoring of plant pathogens and plant species using metabarcoding of pollen pellet contents collected from a honey bee hive. *Environmental DNA*, 1(2), 155-175. doi:10.1002/edn3.17
- Trewavas, E., Green, J., & Corbet, S. A. (1972). Ecological studies on crater lakes in West Cameroon Fishes of Barombi Mbo. *J. Zool., Lond*, 167, 41-95.
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis-A review of methods for



- collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1(2), 1-10. doi:10.1002/edn3.21
- Turner, B. L., Kasperson, R. E., Meyer, W. B., Dow, K. M., Golding, D., Kasperson, J. X., . . . Ratick, S. J. (1990). Two types of global environmental change. *Global Environmental Change*, 1(1), 14-22. doi:10.1016/0959-3780(90)90004-s
- Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 183, 93-102. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.017
- Untergasser. (2020). Primer3Plus. Retrieved from <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol Evol*, 24(2), 110-117. doi:10.1016/j.tree.2008.09.011
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., . . . Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol*, 25(4), 929-942. doi:10.1111/mec.13428
- Valéry, L., Fritz, H., Lefeuvre, J.-C., & Simberloff, D. (2008). In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. *Biological Invasions*, 10(8), 1345-1351. doi:10.1007/s10530-007-9209-7
- van Bochove, K., Bakker, F. T., Beentjes, K. K., Hemerik, L., Vos, R. A., & Gravendeel, B. (2020). Organic matter reduces the amount of detectable environmental DNA in freshwater. *Ecol Evol*, 10(8), 3647-3654. doi:10.1002/ece3.6123
- Van Schayck, C. P. (1985). Preliminary results of an investigation to the effect of aquatic plant control on intermediate hosts of bilharzia, *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*, in the Mansuriya District, Egypt. *Mimeographed report*.
- Vernadsky, V. I. (2000). La Biosphère. Préf. de Jean-Paul Deléage. *Revue d'histoire des sciences*, 53(3), 635-636.
- Vinarski, M. V. (2017). The history of an invasion: phases of the explosive spread of the physid snail *Physella acuta* through Europe, Transcaucasia and Central Asia. *Biological Invasions*, 19(4), 1299-1314. doi:10.1007/s10530-016-1339-3
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos*, 116(5), 882-892. doi:10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x
- Vittecoq, M., Thomas, F., Jourdain, E., Moutou, F., Renaud, F., & Gauthier-Clerc, M. (2014). Risks of emerging infectious diseases: evolving threats in a changing area, the mediterranean basin. *Transbound Emerg Dis*, 61(1), 17-27. doi:10.1111/tbed.12012

- Vorosmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., . . . Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555-561. doi:10.1038/nature09440
- Waldron, A., Miller, D. C., Redding, D., Mooers, A., Kuhn, T. S., Nibbelink, N., . . . Gittleman, J. L. (2017). Reductions in global biodiversity loss predicted from conservation spending. *Nature*, 551(7680), 364-367. doi:10.1038/nature24295
- Warren, D. L., & Seifert, S. N. (2011). Ecological niche modeling in Maxent: the importance of model complexity and the performance of model selection criteria. *Ecol Appl*, 21(2), 335-342. doi:10.1890/10-1171.1
- Watson, S. B., & Lawrence, J. (2003). Overview - Drinking Water Quality and Sustainability. *Water Quality Research Journal*, 38(1), 3-13. doi:10.2166/wqrj.2003.002
- Weerakoon, K. G., Gobert, G. N., Cai, P., & McManus, D. P. (2015). Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*, 28(4), 939-967. doi:10.1128/CMR.00137-14
- Weerakoon, K. G., Gordon, C. A., & McManus, D. P. (2018). DNA Diagnostics for Schistosomiasis Control. *Trop Med Infect Dis*, 3(3). doi:10.3390/tropicalmed3030081
- Welter-Schultes, F. W. (2012). European non-marine molluscs, a guide for species identification. In (First ed., Vol. 1, pp. 679-679). Göttingen: Planet Poster Editions.
- WHO. (2017a). Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis : number of people treated in 2016. *WHO*, 49(92), 11.
- WHO. (2017b, 31 October 2017). Vector-borne diseases. *WHO*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- WHO. (2018). Schistosomiasis. Retrieved from <https://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/table/en/>
- WHO. (2020). Schistosomiasis elimination: refocusing on snail control to sustain progress. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/detail/25-03-2020-schistosomiasis-elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress>
- Wichmann, D., Panning, M., Quack, T., Kramme, S., Burchard, G. D., Grevelding, C., & Drosten, C. (2009). Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(4), e422. doi:10.1371/journal.pntd.0000422
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R., & Schwartz, M. K. (2013). Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS One*, 8(3), e59520-e59520. doi:10.1371/journal.pone.0059520. Epub 2013 Mar 26.
- Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M. B., Brand, T. B., . . . Collins, M. J. (2007). Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science*, 317(5834), 111-114. doi:10.1126/science.1141758

- Willerslev, E., Hansen, A. J., Binladen, J., Brand, T. B., Gilbert, M. T., Shapiro, B., . . . Cooper, A. (2003). Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, 300(5620), 791-795. doi:10.1126/science.1084114
- Williams, M. R., Stedtfeld, R. D., Engle, C., Salach, P., Fakher, U., Stedtfeld, T., . . . Hashsham, S. A. (2017). Isothermal amplification of environmental DNA (eDNA) for direct field-based monitoring and laboratory confirmation of *Dreissena* sp. *PLoS One*, 12(10), e0186462. doi:10.1371/journal.pone.0186462
- WMO. (1992). *WMO and the Ozone Issue*. Retrieved from Geneva: [https://library.wmo.int/index.php?lvl=notice\\_display&id=7613](https://library.wmo.int/index.php?lvl=notice_display&id=7613)
- Wood, C. L., Sokolow, S. H., Jones, I. J., Chamberlin, A. J., Lafferty, K. D., Kuris, A. M., . . . De Leo, G. A. (2019). Precision mapping of snail habitat provides a powerful indicator of human schistosomiasis transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(46), 23182-23191. doi:10.1073/pnas.1903698116
- WorldBank. (2010). *World Development Report 2010 : Development and Climate Change*. Retrieved from Washington, DC.: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/4387>
- Xu, J., Rong, R., Zhang, H. Q., Shi, C. J., Zhu, X. Q., & Xia, C. M. (2010). Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int J Parasitol*, 40(3), 327-331. doi:10.1016/j.ijpara.2009.08.010
- Yang, G. J., & Bergquist, R. (2018). Potential Impact of Climate Change on Schistosomiasis: A Global Assessment Attempt. *Trop Med Infect Dis*, 3(4). doi:10.3390/tropicalmed3040117
- Yates, M. C., Glaser, D. M., Post, J. R., Cristescu, M. E., Fraser, D. J., & Derry, A. M. (2020). The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Mol Ecol*. doi:10.1111/mec.15543
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Zeebe, R. E. (2012). History of Seawater Carbonate Chemistry, Atmospheric CO<sub>2</sub>, and Ocean Acidification. 40(1), 141-165. doi:10.1146/annurev-earth-042711-105521
- Ziegler, A. D., Petney, T. N., Grundy-Warr, C., Andrews, R. H., Baird, I. G., Wasson, R. J., & Sithithaworn, P. (2013). Dams and disease triggers on the lower Mekong river. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(6), e2166. doi:10.1371/journal.pntd.0002166
- Zuckerman, M. K., Harper, K. N., Barrett, R., & Armelagos, G. J. (2014). The evolution of disease: anthropological perspectives on epidemiologic transitions. *Glob Health Action*, 7, 23303. doi:10.3402/gha.v7.23303



## Annexe 2. Matrice de données brutes issues des analyses qPCR de l'expérience contact/persistance menée en mésocosme sur l'ADN environnemental de *Bulinus truncatus*.

| Date       | N°plaque | Code Plaque | N° Tube | Réplica_qPCR | Nom-de_code      | Densité | Durée_contact | Durée_persistance | Ct    | Tm1   | Fluorescence | Tm2   | Fluorescence2 |
|------------|----------|-------------|---------|--------------|------------------|---------|---------------|-------------------|-------|-------|--------------|-------|---------------|
| 25/04/2018 | 3445 A1  |             | 1       |              | 1 D1.1.1.C1.P1   |         | 1 C1          | P1                | 28,65 | 84,47 | 0,69         | 89,81 | 0,79          |
| 25/04/2018 | 3445 B1  |             | 1       |              | 2 D1.1.1.C1.P1   |         | 1 C1          | P1                | 27,39 | 84,39 | 1,16         | 89,81 | 0,73          |
| 25/04/2018 | 3445 C1  |             | 2       |              | 1 D1.1.1.C1.P3   |         | 1 C1          | P3                | 26,52 | 84,84 | 1,57         | 89,68 | 1,06          |
| 25/04/2018 | 3445 D1  |             | 2       |              | 2 D1.1.1.C1.P3   |         | 1 C1          | P3                | 26,55 | 84,85 | 1,37         | 89,71 | 0,99          |
| 25/04/2018 | 3445 E1  |             | 3       |              | 1 D1.1.1.C1.P5   |         | 1 C1          | P5                | 30,97 | 85,23 | 0,41         | 89,79 | 1,2           |
| 25/04/2018 | 3445 F1  |             | 3       |              | 2 D1.1.1.C1.P5   |         | 1 C1          | P5                | 33,87 | 78,24 | 0,7          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 G1  |             | 4       |              | 1 D1.1.1.C1.P10  |         | 1 C1          | P10               | 32,51 | 76,82 | 0,35         | 85,33 | 0,55          |
| 25/04/2018 | 3445 H1  |             | 4       |              | 2 D1.1.1.C1.P10  |         | 1 C1          | P10               | 32,69 | 84,81 | 1,36         | 89,69 | 0,9           |
| 25/04/2018 | 3445 I1  |             | 5       |              | 1 D1.1.1.C1.P15  |         | 1 C1          | P15               | 35,97 | 85,08 | 1,42         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 J1  |             | 5       |              | 2 D1.1.1.C1.P15  |         | 1 C1          | P15               | 32,92 | 79,52 | 0,97         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 K1  |             | 6       |              | 1 D1.1.1.C1.P22  |         | 1 C1          | P22               | 39,27 | 77,75 | 0,54         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L1  |             | 6       |              | 2 D1.1.1.C1.P22  |         | 1 C1          | P22               |       | 78,14 | 0,08         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M1  |             | 7       |              | 1 D1.1.2.C1.P1   |         | 1 C1          | P1                | 27,76 | 84,4  | 1,74         | 89,65 | 0,33          |
| 25/04/2018 | 3445 N1  |             | 7       |              | 2 D1.1.2.C1.P1   |         | 1 C1          | P1                | 28,27 | 84,46 | 1,85         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 O1  |             | 8       |              | 1 D1.1.2.C1.P3   |         | 1 C1          | P3                | 25,58 | 84,64 | 0,72         | 89,61 | 1,49          |
| 25/04/2018 | 3445 P1  |             | 8       |              | 2 D1.1.2.C1.P3   |         | 1 C1          | P3                | 25,43 | 84,68 | 0,7          | 89,64 | 1,47          |
| 25/04/2018 | 3445 A2  |             | 9       |              | 1 D1.1.2.C1.P5   |         | 1 C1          | P5                | 31,42 | 84,94 | 1,42         | 89,79 | 0,88          |
| 25/04/2018 | 3445 B2  |             | 9       |              | 2 D1.1.2.C1.P5   |         | 1 C1          | P5                | 31,75 | 84,93 | 1,31         | 89,74 | 1,08          |
| 25/04/2018 | 3445 C2  |             | 10      |              | 1 D1.1.2.C1.P10  |         | 1 C1          | P10               | 32,74 | 84,67 | 1,18         | 89,7  | 0,9           |
| 25/04/2018 | 3445 D2  |             | 10      |              | 2 D1.1.2.C1.P10  |         | 1 C1          | P10               | 32,64 | 85,21 | 1,52         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E2  |             | 11      |              | 1 D1.1.2.C1.P15  |         | 1 C1          | P15               | 34,64 | 80,32 | 0,44         | 85,2  | 0,55          |
| 25/04/2018 | 3445 F2  |             | 11      |              | 2 D1.1.2.C1.P15  |         | 1 C1          | P15               | 34,57 | 84,94 | 1,52         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 G2  |             | 12      |              | 1 D1.1.2.C1.P22  |         | 1 C1          | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H2  |             | 12      |              | 2 D1.1.2.C1.P22  |         | 1 C1          | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I2  |             | 13      |              | 1 D10.1.1.C1.P1  |         | 10 C1         | P1                | 27,68 | 84,12 | 1,27         | 89,5  | 0,83          |
| 25/04/2018 | 3445 J2  |             | 13      |              | 2 D10.1.1.C1.P1  |         | 10 C1         | P1                | 27,97 | 84,2  | 1,47         | 89,56 | 0,62          |
| 25/04/2018 | 3445 K2  |             | 14      |              | 1 D10.1.1.C1.P3  |         | 10 C1         | P3                | 28,94 | 84,81 | 1,84         | 89,59 | 0,71          |
| 25/04/2018 | 3445 L2  |             | 14      |              | 2 D10.1.1.C1.P3  |         | 10 C1         | P3                | 26,42 | 84,56 | 0,77         | 89,73 | 1,55          |
| 25/04/2018 | 3445 M2  |             | 15      |              | 1 D10.1.1.C1.P5  |         | 10 C1         | P5                | 29,28 | 84,61 | 0,37         | 89,74 | 1,56          |
| 25/04/2018 | 3445 N2  |             | 15      |              | 2 D10.1.1.C1.P5  |         | 10 C1         | P5                | 30,77 | 84,91 | 0,25         | 89,81 | 1,04          |
| 25/04/2018 | 3445 O2  |             | 16      |              | 1 D10.1.1.C1.P10 |         | 10 C1         | P10               | 34,54 | 85,13 | 1,5          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 P2  |             | 16      |              | 2 D10.1.1.C1.P10 |         | 10 C1         | P10               | 33,42 | 85,09 | 1,85         | 89,81 | 0,66          |
| 25/04/2018 | 3445 A3  |             | 17      |              | 1 D10.1.1.C1.P15 |         | 10 C1         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 B3  |             | 17      |              | 2 D10.1.1.C1.P15 |         | 10 C1         | P15               | 39,9  | 77,46 | 0,28         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C3  |             | 18      |              | 1 D10.1.1.C1.P22 |         | 10 C1         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D3  |             | 18      |              | 2 D10.1.1.C1.P22 |         | 10 C1         | P22               | 38,55 | 77,82 | 0,53         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E3  |             | 19      |              | 1 D10.1.2.C1.P1  |         | 10 C1         | P1                | 26,87 | 84,11 | 0,74         | 89,55 | 1,21          |
| 25/04/2018 | 3445 F3  |             | 19      |              | 2 D10.1.2.C1.P1  |         | 10 C1         | P1                | 26,4  | 84,14 | 0,85         | 89,59 | 1,12          |
| 25/04/2018 | 3445 G3  |             | 20      |              | 1 D10.1.2.C1.P3  |         | 10 C1         | P3                | 28,31 | 84,71 | 1,29         | 89,89 | 1,15          |
| 25/04/2018 | 3445 H3  |             | 20      |              | 2 D10.1.2.C1.P3  |         | 10 C1         | P3                | 28,46 | 84,83 | 1,78         | 89,87 | 0,82          |
| 25/04/2018 | 3445 I3  |             | 21      |              | 1 D10.1.2.C1.P5  |         | 10 C1         | P5                | 31,89 |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 J3  |             | 21      |              | 2 D10.1.2.C1.P5  |         | 10 C1         | P5                | 30,82 | 84,87 | 0,75         | 89,79 | 1,14          |
| 25/04/2018 | 3445 K3  |             | 22      |              | 1 D10.1.2.C1.P10 |         | 10 C1         | P10               | 34,48 | 86,59 | 1,02         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L3  |             | 22      |              | 2 D10.1.2.C1.P10 |         | 10 C1         | P10               | 32,5  | 77,79 | 0,32         | 85,03 | 1,54          |
| 25/04/2018 | 3445 M3  |             | 23      |              | 1 D10.1.2.C1.P15 |         | 10 C1         | P15               | 37,28 | 85,04 | 1,37         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 N3  |             | 23      |              | 2 D10.1.2.C1.P15 |         | 10 C1         | P15               | 38,64 | 77,69 | 0,67         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 O3  |             | 24      |              | 1 D10.1.2.C1.P22 |         | 10 C1         | P22               | 39,53 | 77,69 | 0,59         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 P3  |             | 24      |              | 2 D10.1.2.C1.P22 |         | 10 C1         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 A4  |             | 25      |              | 1 D64.1.1.C1.P1  |         | 64 C1         | P1                | 26,32 | 80,92 | 0,34         | 89,8  | 0,51          |
| 25/04/2018 | 3445 B4  |             | 25      |              | 2 D64.1.1.C1.P1  |         | 64 C1         | P1                | 25,41 | 83,02 | 0,49         | 90,16 | 0,62          |
| 25/04/2018 | 3445 C4  |             | 26      |              | 1 D64.1.1.C1.P3  |         | 64 C1         | P3                | 24,91 | 89,51 | 2,39         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D4  |             | 26      |              | 2 D64.1.1.C1.P3  |         | 64 C1         | P3                | 25,91 | 89,51 | 2,27         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E4  |             | 27      |              | 1 D64.1.1.C1.P5  |         | 64 C1         | P5                | 31,79 | 80,38 | 0,23         | 89,45 | 1,03          |
| 25/04/2018 | 3445 F4  |             | 27      |              | 2 D64.1.1.C1.P5  |         | 64 C1         | P5                | 29,84 | 89,58 | 1,7          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 G4  |             | 28      |              | 1 D64.1.1.C1.P10 |         | 64 C1         | P10               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H4  |             | 28      |              | 2 D64.1.1.C1.P10 |         | 64 C1         | P10               |       | 75,32 | 0,01         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I4  |             | 29      |              | 1 D64.1.1.C1.P15 |         | 64 C1         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 J4  |             | 29      |              | 2 D64.1.1.C1.P15 |         | 64 C1         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 K4  |             | 30      |              | 1 D64.1.1.C1.P22 |         | 64 C1         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L4  |             | 30      |              | 2 D64.1.1.C1.P22 |         | 64 C1         | P22               |       | 69,57 | 0,04         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M4  |             | 31      |              | 1 D64.1.2.C1.P1  |         | 64 C1         | P1                | 24,8  | 89,83 | 0,69         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 N4  |             | 31      |              | 2 D64.1.2.C1.P1  |         | 64 C1         | P1                | 26,5  | 82,87 | 0,35         | 89,59 | 0,73          |
| 25/04/2018 | 3445 O4  |             | 32      |              | 1 D64.1.2.C1.P3  |         | 64 C1         | P3                | 28,38 | 79,26 | 0,43         | 85,08 | 0,71          |
| 25/04/2018 | 3445 P4  |             | 32      |              | 2 D64.1.2.C1.P3  |         | 64 C1         | P3                | 28,44 | 81,55 | 0,3          | 84,99 | 0,93          |
| 25/04/2018 | 3445 A5  |             | 33      |              | 1 D64.1.2.C1.P5  |         | 64 C1         | P5                | 30,93 | 86,23 | 0,49         | 89,85 | 1,19          |
| 25/04/2018 | 3445 B5  |             | 33      |              | 2 D64.1.2.C1.P5  |         | 64 C1         | P5                | 30,35 | 86,33 | 0,6          | 89,91 | 1,06          |
| 25/04/2018 | 3445 C5  |             | 34      |              | 1 D64.1.2.C1.P10 |         | 64 C1         | P10               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D5  |             | 34      |              | 2 D64.1.2.C1.P10 |         | 64 C1         | P10               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E5  |             | 35      |              | 1 D64.1.2.C1.P15 |         | 64 C1         | P15               | 39,67 | 81,16 | 0,4          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 F5  |             | 35      |              | 2 D64.1.2.C1.P15 |         | 64 C1         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 G5  |             | 36      |              | 1 D64.1.2.C1.P22 |         | 64 C1         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H5  |             | 36      |              | 2 D64.1.2.C1.P22 |         | 64 C1         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I5  |             | 37      |              | 1 D1.2.1.C1.P1   |         | 1 C1          | P1                | 26,9  | 84,34 | 1,82         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 J5  |             | 37      |              | 2 D1.2.1.C1.P1   |         | 1 C1          | P1                | 27,44 | 84,4  | 1,96         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 K5  |             | 38      |              | 1 D1.2.1.C1.P3   |         | 1 C1          | P3                |       | 75,21 | 0,01         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L5  |             | 38      |              | 2 D1.2.1.C1.P3   |         | 1 C1          | P3                |       | 76,14 | 0,01         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M5  |             | 39      |              | 1 D1.2.1.C1.P5   |         | 1 C1          | P5                | 31,77 | 84,72 | 0,88         | 89,5  | 1,47          |
| 25/04/2018 | 3445 N5  |             | 39      |              | 2 D1.2.1.C1.P5   |         | 1 C1          | P5                | 31,62 | 84,64 | 1,48         | 89,41 | 1,07          |
| 25/04/2018 | 3445 O5  |             | 40      |              | 1 D1.2.1.C1.P10  |         | 1 C1          | P10               | 32,27 | 78,36 | 0,47         | 85    | 1,02          |
| 25/04/2018 | 3445 P5  |             | 40      |              | 2 D1.2.1.C1.P10  |         | 1 C1          | P10               | 33,56 | 85,19 | 2,42         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 A6  |             | 41      |              | 1 D1.2.1.C1.P15  |         | 1 C1          | P15               | 33,53 | 85,15 | 1,46         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 B6  |             | 41      |              | 2 D1.2.1.C1.P15  |         | 1 C1          | P15               | 33,7  | 84,93 | 1,23         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C6  |             | 42      |              | 1 D1.2.1.C1.P22  |         | 1 C1          | P22               | 34,4  | 85,06 | 1,8          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D6  |             | 42      |              | 2 D1.2.1.C1.P22  |         | 1 C1          | P22               | 34,94 | 85,24 | 1,7          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E6  |             | 43      |              | 1 D1.2.2.C1.P1   |         | 1 C1          | P1                | 27,76 | 84,35 | 1,7          | 89,66 | 0,4           |
| 25/04/2018 | 3445 F6  |             | 43      |              | 2 D1.2.2.C1.P1   |         | 1 C1          | P1                | 27,55 | 84,27 | 1,74         | 89,72 | 0,41          |
| 25/04/2018 | 3445 G6  |             | 44      |              | 1 D1.2.2.C1.P3   |         | 1 C1          | P3                | 28,36 | 84,83 | 2,03         | 89,7  | 0,69          |
| 25/04/2018 | 3445 H6  |             | 44      |              | 2 D1.2.2.C1.P3   |         | 1 C1          | P3                | 26,97 | 84,79 | 1,76         | 89,7  | 0,78          |
| 25/04/2018 | 3445 I6  |             | 45      |              | 1 D1.2.2.C1.P5   |         | 1 C1          | P5                | 30,68 | 84,26 | 0,46         | 89,61 | 1,68          |
| 25/04/2018 | 3445 J6  |             | 45      |              | 2 D1.2.2.C1.P5   |         | 1 C1          | P5                | 30,41 | 84,18 | 0,57         | 89,54 | 1,64          |
| 25/04/2018 | 3445 K6  |             | 46      |              | 1 D1.2.2.C1.P10  |         | 1 C1          | P10               | 33,62 | 84,82 | 1,58         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L6  |             | 46      |              | 2 D1.2.2.C1.P10  |         | 1 C1          | P10               | 33,43 | 85,11 | 1,9          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M6  |             | 47      |              | 1 D1.2.2.C1.P15  |         | 1 C1          | P15               | 32,88 | 78,43 | 0,41         | 84,81 | 0,84          |
| 25/04/2018 | 3445 N6  |             | 47      |              | 2 D1.2.2.C1.P15  |         | 1 C1          | P15               | 32,74 | 79,41 | 0,41         | 85,04 | 1             |
| 25/04/2018 | 3445 O6  |             | 48      |              | 1 D1.2.2.C1.P22  |         | 1 C1          | P22               | 36,7  | 76,61 | 0,32         | 85,18 | 1,05          |
| 25/04/2018 | 3445 P6  |             | 48      |              | 2 D1.2.2.C1.P22  |         | 1 C1          | P22               | 34,16 | 78,39 | 1,21         | 85,18 | 0,52          |
| 25/04/2018 | 3445 A7  |             | 49      |              | 1 D10.2.1.C1.P1  |         | 10 C1         | P1                | 27,96 | 84,36 | 1,15         | 89,82 | 0,65          |
| 25/04/2018 | 3445 B7  |             | 49      |              | 2 D10.2.1.C1.P1  |         | 10 C1         | P1                | 27,72 | 84,29 | 1,09         | 89,73 | 0,75          |
| 25/04/2018 | 3445 C7  |             | 50      |              | 1 D10.2.1.C1.P3  |         | 10 C1         | P3                | 25,9  | 84,5  | 0,69         | 89,83 | 1,38          |
| 25/04/2018 | 3445 D7  |             | 50      |              | 2 D10.2.1.C1.P3  |         | 10 C1         | P3                | 25,7  | 84,41 | 0,53         | 89,82 |               |



| Date       | N° plaque | Code_Plaque | N° Tube | Réplica_qPCR | Nom-de_code      | Densité | Durée_contact | Durée_persistence | Ct    | Tm1   | Fluorescence | Tm2   | Fluorescence2 |
|------------|-----------|-------------|---------|--------------|------------------|---------|---------------|-------------------|-------|-------|--------------|-------|---------------|
| 25/04/2018 | 3445 E7   |             | 51      |              | 1 D10.2.1.C1.P5  |         | 10 C1         | P5                | 31,42 | 77,05 | 0,35         | 88,01 | 0,67          |
| 25/04/2018 | 3445 F7   |             | 51      |              | 2 D10.2.1.C1.P5  |         | 10 C1         | P5                | 33,31 | 84,71 | 1,64         | 89,75 | 0,85          |
| 25/04/2018 | 3445 G7   |             | 52      |              | 1 D10.2.1.C1.P10 |         | 10 C1         | P10               | 33,44 | 89,77 | 1,46         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H7   |             | 52      |              | 2 D10.2.1.C1.P10 |         | 10 C1         | P10               | 32,65 | 86,56 | 0,61         | 89,9  | 0,84          |
| 25/04/2018 | 3445 I7   |             | 53      |              | 1 D10.2.1.C1.P15 |         | 10 C1         | P15               | 36,56 | 76,37 | 0,31         | 85,16 | 0,9           |
| 25/04/2018 | 3445 J7   |             | 53      |              | 2 D10.2.1.C1.P15 |         | 10 C1         | P15               | 35,23 | 76,42 | 0,31         | 84,86 | 1,31          |
| 25/04/2018 | 3445 K7   |             | 54      |              | 1 D10.2.1.C1.P22 |         | 10 C1         | P22               | 36,81 | 79,98 | 0,92         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L7   |             | 54      |              | 2 D10.2.1.C1.P22 |         | 10 C1         | P22               | 36,36 | 79,21 | 0,77         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M7   |             | 55      |              | 1 D10.2.2.C1.P1  |         | 10 C1         | P1                | 27,42 | 84,26 | 1,52         | 89,71 | 0,61          |
| 25/04/2018 | 3445 N7   |             | 55      |              | 2 D10.2.2.C1.P1  |         | 10 C1         | P1                | 27,55 | 84,17 | 1,45         | 89,6  | 1,06          |
| 25/04/2018 | 3445 O7   |             | 56      |              | 1 D10.2.2.C1.P3  |         | 10 C1         | P3                | 26,28 | 84,44 | 0,49         | 89,68 | 1,49          |
| 25/04/2018 | 3445 P7   |             | 56      |              | 2 D10.2.2.C1.P3  |         | 10 C1         | P3                | 26,63 | 84,36 | 0,46         | 89,66 | 1,52          |
| 25/04/2018 | 3445 A8   |             | 57      |              | 1 D10.2.2.C1.P5  |         | 10 C1         | P5                | 27,86 | 89,82 | 1,76         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 B8   |             | 57      |              | 2 D10.2.2.C1.P5  |         | 10 C1         | P5                | 27,95 | 89,69 | 1,9          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C8   |             | 58      |              | 1 D10.2.2.C1.P10 |         | 10 C1         | P10               | 32,5  | 78,05 | 0,26         | 84,95 | 1,02          |
| 25/04/2018 | 3445 D8   |             | 58      |              | 2 D10.2.2.C1.P10 |         | 10 C1         | P10               | 31,93 | 84,8  | 1,65         | 89,85 | 0,87          |
| 25/04/2018 | 3445 E8   |             | 59      |              | 1 D10.2.2.C1.P15 |         | 10 C1         | P15               | 35,94 | 85,21 | 2,04         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 F8   |             | 59      |              | 2 D10.2.2.C1.P15 |         | 10 C1         | P15               | 34,46 | 78,64 | 1,33         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 G8   |             | 60      |              | 1 D10.2.2.C1.P22 |         | 10 C1         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H8   |             | 60      |              | 2 D10.2.2.C1.P22 |         | 10 C1         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I8   |             | 61      |              | 1 D64.2.1.C1.P1  |         | 64 C1         | P1                | 25,48 | 82,95 | 0,3          | 89,66 | 0,85          |
| 25/04/2018 | 3445 J8   |             | 61      |              | 2 D64.2.1.C1.P1  |         | 64 C1         | P1                | 25,55 | 81,64 | 0,39         | 89,63 | 0,86          |
| 25/04/2018 | 3445 K8   |             | 62      |              | 1 D64.2.1.C1.P3  |         | 64 C1         | P3                | 26,63 | 86,92 | 0,69         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L8   |             | 62      |              | 2 D64.2.1.C1.P3  |         | 64 C1         | P3                | 26,42 | 80,13 | 0,41         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M8   |             | 63      |              | 1 D64.2.1.C1.P5  |         | 64 C1         | P5                | 31,15 | 85,29 | 0,39         | 89,59 | 1,33          |
| 25/04/2018 | 3445 N8   |             | 63      |              | 2 D64.2.1.C1.P5  |         | 64 C1         | P5                | 35,39 | 84,91 | 1,43         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 O8   |             | 64      |              | 1 D64.2.1.C1.P10 |         | 64 C1         | P10               | 36,53 | 84,96 | 1,11         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 P8   |             | 64      |              | 2 D64.2.1.C1.P10 |         | 64 C1         | P10               | 30,87 | 89,57 | 1,3          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 A9   |             | 65      |              | 1 D64.2.1.C1.P15 |         | 64 C1         | P15               | 78,44 | 0,08  |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 B9   |             | 65      |              | 2 D64.2.1.C1.P15 |         | 64 C1         | P15               | 39,33 | 79,47 | 0,78         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C9   |             | 66      |              | 1 D64.2.1.C1.P22 |         | 64 C1         | P22               |       | 77,33 | 0,01         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D9   |             | 66      |              | 2 D64.2.1.C1.P22 |         | 64 C1         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E9   |             | 67      |              | 1 D64.2.2.C1.P1  |         | 64 C1         | P1                | 26,19 | 78,36 | 0,91         | 89,39 | 0,31          |
| 25/04/2018 | 3445 F9   |             | 67      |              | 2 D64.2.2.C1.P1  |         | 64 C1         | P1                | 25,88 | 78,73 | 0,79         | 89,4  | 0,62          |
| 25/04/2018 | 3445 G9   |             | 68      |              | 1 D64.2.2.C1.P3  |         | 64 C1         | P3                | 29,57 | 85,13 | 0,27         | 89,72 | 1,35          |
| 25/04/2018 | 3445 H9   |             | 68      |              | 2 D64.2.2.C1.P3  |         | 64 C1         | P3                | 29,37 | 84,21 | 0,3          | 89,71 | 1,06          |
| 25/04/2018 | 3445 I9   |             | 69      |              | 1 D64.2.2.C1.P5  |         | 64 C1         | P5                | 32,79 | 77,82 | 0,35         | 84,96 | 0,8           |
| 25/04/2018 | 3445 J9   |             | 69      |              | 2 D64.2.2.C1.P5  |         | 64 C1         | P5                | 33    | 79,05 | 0,68         | 88,27 | 0,41          |
| 25/04/2018 | 3445 K9   |             | 70      |              | 1 D64.2.2.C1.P10 |         | 64 C1         | P10               | 34,34 | 84,68 | 1,33         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L9   |             | 70      |              | 2 D64.2.2.C1.P10 |         | 64 C1         | P10               | 32,8  | 77,75 | 0,34         | 84,64 | 1,27          |
| 25/04/2018 | 3445 M9   |             | 71      |              | 1 D64.2.2.C1.P15 |         | 64 C1         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 N9   |             | 71      |              | 2 D64.2.2.C1.P15 |         | 64 C1         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 O9   |             | 72      |              | 1 D64.2.2.C1.P22 |         | 64 C1         | P22               | 40,72 | 77,89 | 0,39         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 P9   |             | 72      |              | 2 D64.2.2.C1.P22 |         | 64 C1         | P22               |       | 80,04 | 0,03         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 A10  |             | 73      |              | 1 NEG1.C1        | NEG     | C1            | NA                | 41,69 | 77,48 | 0,31         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 B10  |             | 73      |              | 2 NEG1.C1        | NEG     | C1            | NA                | 34,51 | 79,46 | 1,03         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C10  |             | 74      |              | 1 NEG2.C1        | NEG     | C1            | NA                | 37,88 | 77,52 | 0,86         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D10  |             | 74      |              | 2 NEG2.C1        | NEG     | C1            | NA                | 37    | 77,22 | 1,01         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E10  |             | 75      |              | 1 D11.1.C6.P1    |         | 1 C6          | P1                | 28,78 | 89,99 | 1,78         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 F10  |             | 75      |              | 2 D11.1.C6.P1    |         | 1 C6          | P1                | 27,71 | 90,03 | 1,95         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 G10  |             | 76      |              | 1 D11.1.C6.P3    |         | 1 C6          | P3                | 31,49 | 90,12 | 1,41         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H10  |             | 76      |              | 2 D11.1.C6.P3    |         | 1 C6          | P3                | 31,27 | 81,07 | 0,3          | 90,01 | 1,12          |
| 25/04/2018 | 3445 I10  |             | 77      |              | 1 D11.1.C6.P5    |         | 1 C6          | P5                | 33,95 | 80,78 | 0,38         | 89,9  | 0,68          |
| 25/04/2018 | 3445 J10  |             | 77      |              | 2 D11.1.C6.P5    |         | 1 C6          | P5                | 33,81 | 84,91 | 0,57         | 90,19 | 1,47          |
| 25/04/2018 | 3445 K10  |             | 78      |              | 1 D11.1.C6.P10   |         | 1 C6          | P10               | 33,98 | 84,59 | 0,4          | 89,89 | 1,02          |
| 25/04/2018 | 3445 L10  |             | 78      |              | 2 D11.1.C6.P10   |         | 1 C6          | P10               | 33,64 | 85,35 | 2,09         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M10  |             | 79      |              | 1 D11.1.C6.P15   |         | 1 C6          | P15               | 37,54 | 76,9  | 0,79         | 85,29 | 0,75          |
| 25/04/2018 | 3445 N10  |             | 79      |              | 2 D11.1.C6.P15   |         | 1 C6          | P15               | 34,97 | 82,91 | 1,25         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 O10  |             | 80      |              | 1 D11.1.C6.P22   |         | 1 C6          | P22               | 38,97 | 77,55 | 0,64         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 P10  |             | 80      |              | 2 D11.1.C6.P22   |         | 1 C6          | P22               | 34,7  | 80,57 | 1,03         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 A11  |             | 81      |              | 1 D11.2.C6.P1    |         | 1 C6          | P1                | 30,4  | 90,23 | 1,49         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 B11  |             | 81      |              | 2 D11.2.C6.P1    |         | 1 C6          | P1                | 29,7  | 90,17 | 1,63         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C11  |             | 82      |              | 1 D11.2.C6.P3    |         | 1 C6          | P3                | 30,26 | 90    | 1,53         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D11  |             | 82      |              | 2 D11.2.C6.P3    |         | 1 C6          | P3                | 29,6  | 89,96 | 1,19         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E11  |             | 83      |              | 1 D11.2.C6.P5    |         | 1 C6          | P5                | 35,81 | 84,95 | 0,27         | 90,4  | 1,22          |
| 25/04/2018 | 3445 F11  |             | 83      |              | 2 D11.2.C6.P5    |         | 1 C6          | P5                | 33,37 | 78,53 | 0,41         | 84,9  | 0,55          |
| 25/04/2018 | 3445 G11  |             | 84      |              | 1 D11.2.C6.P10   |         | 1 C6          | P10               | 33,56 | 78,95 | 1,19         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H11  |             | 84      |              | 2 D11.2.C6.P10   |         | 1 C6          | P10               | 34,53 | 79,52 | 1,05         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I11  |             | 85      |              | 1 D11.2.C6.P15   |         | 1 C6          | P15               | 33,7  | 80,25 | 0,45         | 85,82 | 0,58          |
| 25/04/2018 | 3445 J11  |             | 85      |              | 2 D11.2.C6.P15   |         | 1 C6          | P15               | 35,46 | 76,02 | 0,31         | 83,57 | 0,91          |
| 25/04/2018 | 3445 K11  |             | 86      |              | 1 D11.2.C6.P22   |         | 1 C6          | P22               | 37,56 | 77,12 | 0,61         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L11  |             | 86      |              | 2 D11.2.C6.P22   |         | 1 C6          | P22               | 37,67 | 77,11 | 0,59         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M11  |             | 87      |              | 1 D10.1.1.C6.P1  |         | 10 C6         | P1                | 31,68 | 81,22 | 0,38         | 89,49 | 0,74          |
| 25/04/2018 | 3445 N11  |             | 87      |              | 2 D10.1.1.C6.P1  |         | 10 C6         | P1                | 31,62 | 80,92 | 0,34         | 89,5  | 0,81          |
| 25/04/2018 | 3445 O11  |             | 88      |              | 1 D10.1.1.C6.P3  |         | 10 C6         | P3                | 32,37 | 79,38 | 1,2          | 84,93 | 0,69          |
| 25/04/2018 | 3445 P11  |             | 88      |              | 2 D10.1.1.C6.P3  |         | 10 C6         | P3                | 31,82 | 79,75 | 1,15         | 85    | 0,66          |
| 25/04/2018 | 3445 A12  |             | 89      |              | 1 D10.1.1.C6.P5  |         | 10 C6         | P5                | 32,9  | 79,58 | 1,32         | 86,26 | 0,42          |
| 25/04/2018 | 3445 B12  |             | 89      |              | 2 D10.1.1.C6.P5  |         | 10 C6         | P5                | 32,99 | 79,56 | 1,38         | 84,08 | 0,68          |
| 25/04/2018 | 3445 C12  |             | 90      |              | 1 D10.1.1.C6.P10 |         | 10 C6         | P10               | 36,91 | 78,08 | 0,7          |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D12  |             | 90      |              | 2 D10.1.1.C6.P10 |         | 10 C6         | P10               | 34,9  | 79,99 | 0,82         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E12  |             | 91      |              | 1 D10.1.1.C6.P15 |         | 10 C6         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 F12  |             | 91      |              | 2 D10.1.1.C6.P15 |         | 10 C6         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 G12  |             | 92      |              | 1 D10.1.1.C6.P22 |         | 10 C6         | P22               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H12  |             | 92      |              | 2 D10.1.1.C6.P22 |         | 10 C6         | P22               |       | 76,16 | 0,02         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I12  |             | 93      |              | 1 D10.1.2.C6.P1  |         | 10 C6         | P1                | 33,41 | 80,11 | 0,84         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 J12  |             | 93      |              | 2 D10.1.2.C6.P1  |         | 10 C6         | P1                | 31,9  | 78,97 | 0,9          | 86,1  | 0,37          |
| 25/04/2018 | 3445 K12  |             | 94      |              | 1 D10.1.2.C6.P3  |         | 10 C6         | P3                | 32,94 | 79,57 | 0,67         | 85,04 | 0,71          |
| 25/04/2018 | 3445 L12  |             | 94      |              | 2 D10.1.2.C6.P3  |         | 10 C6         | P3                | 32,79 | 79,1  | 0,64         | 85,25 | 0,7           |
| 25/04/2018 | 3445 M12  |             | 95      |              | 1 D10.1.2.C6.P5  |         | 10 C6         | P5                | 32,79 | 79,13 | 1            | 84,13 | 0,97          |
| 25/04/2018 | 3445 N12  |             | 95      |              | 2 D10.1.2.C6.P5  |         | 10 C6         | P5                | 32,65 | 79,29 | 1,29         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 O12  |             | 96      |              | 1 D10.1.2.C6.P10 |         | 10 C6         | P10               | 42,66 | 78,02 | 0,16         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 P12  |             | 96      |              | 2 D10.1.2.C6.P10 |         | 10 C6         | P10               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 A13  |             | 97      |              | 1 D10.1.2.C6.P15 |         | 10 C6         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 B13  |             | 97      |              | 2 D10.1.2.C6.P15 |         | 10 C6         | P15               |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C13  |             | 98      |              | 1 D10.1.2.C6.P22 |         | 10 C6         | P22               |       | 79,4  | 0,01         |       |               |

| Date       | N°plaque | Code_Plaque | N° Tube | Réplica_qPCR | Nom-de_code      | Densité | Durée_contact | Durée_persistence | Ct    | Tm1   | Fluorescence | Tm2   | Fluorescence2 |
|------------|----------|-------------|---------|--------------|------------------|---------|---------------|-------------------|-------|-------|--------------|-------|---------------|
| 25/04/2018 | 3445 D13 |             | 98      |              | 2 D10.1.2.C6.P22 | 10 C6   | P22           |                   | 34,7  | 79,11 | 1,03         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E13 |             | 99      |              | 1 D64.1.1.C6.P1  | 64 C6   | P1            |                   | 9,34  | 78,66 | 1,25         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 F13 |             | 99      |              | 2 D64.1.1.C6.P1  | 64 C6   | P1            |                   | 8,7   | 78,44 | 1,19         | 85,87 | 0,41          |
| 25/04/2018 | 3445 G13 |             | 100     |              | 1 D64.1.1.C6.P3  | 64 C6   | P3            |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H13 |             | 100     |              | 2 D64.1.1.C6.P3  | 64 C6   | P3            |                   | 34,7  | 79,32 | 1,07         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I13 |             | 101     |              | 1 D64.1.1.C6.P5  | 64 C6   | P5            |                   | 40,63 | 77,93 | 0,38         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 J13 |             | 101     |              | 2 D64.1.1.C6.P5  | 64 C6   | P5            |                   | 40,69 | 77,85 | 0,47         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 K13 |             | 102     |              | 1 D64.1.1.C6.P10 | 64 C6   | P10           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L13 |             | 102     |              | 2 D64.1.1.C6.P10 | 64 C6   | P10           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M13 |             | 103     |              | 1 D64.1.1.C6.P15 | 64 C6   | P15           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 N13 |             | 103     |              | 2 D64.1.1.C6.P15 | 64 C6   | P15           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 O13 |             | 104     |              | 1 D64.1.1.C6.P22 | 64 C6   | P22           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 P13 |             | 104     |              | 2 D64.1.1.C6.P22 | 64 C6   | P22           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 A14 |             | 105     |              | 1 D64.1.2.C6.P1  | 64 C6   | P1            |                   | 30,81 | 78,92 | 0,98         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 B14 |             | 105     |              | 2 D64.1.2.C6.P1  | 64 C6   | P1            |                   | 26,7  | 78,78 | 1,27         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C14 |             | 106     |              | 1 D64.1.2.C6.P3  | 64 C6   | P3            |                   | 39,29 | 79,44 | 0,86         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 D14 |             | 106     |              | 2 D64.1.2.C6.P3  | 64 C6   | P3            |                   | 37,77 | 79,45 | 0,25         | 85,96 | 1,07          |
| 25/04/2018 | 3445 E14 |             | 107     |              | 1 D64.1.2.C6.P5  | 64 C6   | P5            |                   |       | 78,61 | 0,08         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 F14 |             | 107     |              | 2 D64.1.2.C6.P5  | 64 C6   | P5            |                   | 37,91 | 77,74 | 0,76         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 G14 |             | 108     |              | 1 D64.1.2.C6.P10 | 64 C6   | P10           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H14 |             | 108     |              | 2 D64.1.2.C6.P10 | 64 C6   | P10           |                   |       | 77,14 | 0,02         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I14 |             | 109     |              | 1 D64.1.2.C6.P15 | 64 C6   | P15           |                   | 38,69 | 79,11 | 1,06         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 J14 |             | 109     |              | 2 D64.1.2.C6.P15 | 64 C6   | P15           |                   | 37,35 | 78,05 | 0,95         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 K14 |             | 110     |              | 1 D64.1.2.C6.P22 | 64 C6   | P22           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L14 |             | 110     |              | 2 D64.1.2.C6.P22 | 64 C6   | P22           |                   |       |       |              |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M14 |             | 111     |              | 1 D1.2.1.C6.P1   | 1 C6    | P1            |                   | 34,44 | 84,51 | 0,6          | 89,88 | 0,84          |
| 25/04/2018 | 3445 N14 |             | 111     |              | 2 D1.2.1.C6.P1   | 1 C6    | P1            |                   | 33,6  | 84,89 | 0,89         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 O14 |             | 112     |              | 1 D1.2.1.C6.P3   | 1 C6    | P3            |                   | 34,54 | 79,5  | 1,33         | 86,27 | 0,68          |
| 25/04/2018 | 3445 P14 |             | 112     |              | 2 D1.2.1.C6.P3   | 1 C6    | P3            |                   | 34,36 | 85,41 | 1,27         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 A15 |             | 113     |              | 1 D1.2.1.C6.P5   | 1 C6    | P5            |                   | 35,45 | 79,89 | 0,94         | 86,09 | 0,19          |
| 25/04/2018 | 3445 B15 |             | 113     |              | 2 D1.2.1.C6.P5   | 1 C6    | P5            |                   | 34,82 | 85,31 | 1,69         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 C15 |             | 114     |              | 1 D1.2.1.C6.P10  | 1 C6    | P10           |                   | 36,85 | 79,58 | 0,79         | 87,36 | 0,7           |
| 25/04/2018 | 3445 D15 |             | 114     |              | 2 D1.2.1.C6.P10  | 1 C6    | P10           |                   | 34,81 | 80,13 | 0,77         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 E15 |             | 115     |              | 1 D1.2.1.C6.P15  | 1 C6    | P15           |                   | 36,38 | 77,48 | 0,74         | 88,06 | 0,24          |
| 25/04/2018 | 3445 F15 |             | 115     |              | 2 D1.2.1.C6.P15  | 1 C6    | P15           |                   | 35,78 | 77,3  | 0,86         | 86,81 | 0,23          |
| 25/04/2018 | 3445 G15 |             | 116     |              | 1 D1.2.1.C6.P22  | 1 C6    | P22           |                   | 35,49 | 79,35 | 1,02         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 H15 |             | 116     |              | 2 D1.2.1.C6.P22  | 1 C6    | P22           |                   | 37,37 | 77,09 | 0,93         | 85,09 | 0,66          |
| 24/04/2018 | 3441 A14 |             | 117     |              | 1 D1.2.2.C6.P1   | 1 C6    | P1            |                   | 38,7  |       |              |       |               |
| 24/04/2018 | 3441 B14 |             | 117     |              | 2 D1.2.2.C6.P1   | 1 C6    | P1            |                   | 36,52 | 83,39 | 1,97         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 I15 |             | 117     |              | 1 D1.2.2.C6.P1   | 1 C6    | P1            |                   | 37,71 | 76,75 | 0,42         | 85,6  | 1,16          |
| 25/04/2018 | 3445 J15 |             | 117     |              | 2 D1.2.2.C6.P1   | 1 C6    | P1            |                   | 34,84 | 85,56 | 0,79         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 K15 |             | 118     |              | 1 D1.2.2.C6.P3   | 1 C6    | P3            |                   | 35    | 85,44 | 1,71         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 L15 |             | 118     |              | 2 D1.2.2.C6.P3   | 1 C6    | P3            |                   | 34,69 | 85,44 | 1,51         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 M15 |             | 119     |              | 1 D1.2.2.C6.P5   | 1 C6    | P5            |                   | 37,4  | 77,17 | 0,53         | 86,76 | 0,51          |
| 25/04/2018 | 3445 N15 |             | 119     |              | 2 D1.2.2.C6.P5   | 1 C6    | P5            |                   | 34,72 | 85,41 | 2,02         | 89,4  | 0,43          |
| 25/04/2018 | 3445 O15 |             | 120     |              | 1 D1.2.2.C6.P10  | 1 C6    | P10           |                   | 36,57 | 79,59 | 0,81         |       |               |
| 25/04/2018 | 3445 P15 |             | 120     |              | 2 D1.2.2.C6.P10  | 1 C6    | P10           |                   | 36,56 | 79,13 | 0,49         | 86,53 | 0,79          |



**RÉSUMÉ :** Les changements globaux, qu'ils soient d'origine climatique ou anthropique ont diverses conséquences en santé humaine et animale, mais aussi sur les écosystèmes mondiaux. L'une des plus importantes est la modification des aires de répartitions géographiques des espèces et de celle des pathogènes qui leurs sont associés. C'est dans ce contexte que nous assistons ces dernières années à une recrudescence des cas d'émergences et de réémergences de maladies infectieuses dans le monde. Alors que les efforts de recherche menés dans ce domaine se focalisent principalement sur les maladies virales, les maladies transmises par les mollusques d'eau douce, qui affectent plus d'un milliard d'individus dans le monde, sont également sujettes à ces événements d'émergences devenus fréquents. Cependant, l'étude de la dynamique des parasites associés à ces maladies se focalisent essentiellement sur le diagnostic et le traitement des hôtes définitifs, en particulier l'Homme. Toutefois, une telle approche ne permet pas de prévenir de la transmission de ces parasites à l'Homme et encore moins de prévenir d'un événement d'émergence, et les outils actuels utilisés pour le suivi de ces parasites dans l'environnement sont difficilement applicables à large échelle. Ce travail de thèse se propose donc d'apporter une vision plus environnementale de la dynamique de ces maladies. Avec l'exemple de l'émergence de bilharziose urogénitale en Corse, nous avons analysé cette émergence en intégrant l'étude des traits d'histoire de vie du parasite tropical en cause, notamment sa thermo tolérance, ainsi que le rôle des hôtes intermédiaires mollusques et des hôtes définitifs sauvages et domestiques dans le maintien local du cycle parasitaire. Dans un second temps nous avons développé des outils de diagnostic par ADN environnemental pour la détection de mollusques hôtes dans l'environnement afin d'identifier les zones à risque d'émergence, ainsi que des outils de détection intramolluscal de schistosomes pour identifier les sites de transmission actif, et donc permettre un suivi environnemental des acteurs de ces maladies. Pour compléter ces approches, nous avons développé un outil plus généraliste de metabarcoding environnemental pour caractériser les communautés de mollusques d'eau douce, et initié le développement d'un outil similaire pour la caractérisation des communautés de trématodes, ceci afin d'étudier les interactions entre ces organismes. Enfin nous discutons de l'intégrations de tous ces éléments dans de nouvelles stratégies de contrôle à l'encontre de maladies transmises par les mollusques d'eau douce.

**Mots clés :** ADN environnemental, anthropocène, changements globaux, maladies transmises par les mollusques, metabarcoding environnemental, suivi environnemental, trématodes.

---

**ABSTRACT:** Global changes, whether climatic or anthropogenic, have various consequences in human and animal health, as well as for worldwide ecosystems. One of the most important is the modification of geographical ranges of species and those of their associated pathogens. It is in this context that in recent years we have witnessed a resurgence in the emergence and re-emergence of infectious diseases around the world. While research efforts in this field are mainly focused on viral diseases, freshwater snail-borne diseases, that affect more than 1 billion peoples around the world, are also subject to these outbreaks, which have become frequent. However, the study of the dynamics of parasites associated with these diseases focuses primarily on the diagnosis and treatment of the definitive hosts, particularly humans. Such an approach does not prevent the transmission of these parasites to humans and even less prevent an emergence event, and the existing tools used to monitor these parasites in the environment are difficult to apply at large scale. This thesis work, therefore aims to provide a more environmental vision of the dynamics of these diseases. With the example of the emergence of urogenital bilharziasis in Corsica, we analysed this emergence by integrating the study of the life history traits of the tropical parasite in question, particularly its thermo tolerance, as well as the role of mollusc intermediate hosts and wild and domestic definitive hosts in the local maintenance of the parasite lifecycle. In a second step, we have developed environmental DNA diagnostic tools for the detection of molluscs hosts in the environment in order to identify areas at risk of emergence, as well as tools for intramolluscal detection of schistosomes to identify active sites of transmission, and thus allow the environmental monitoring of the actors of these diseases. To complete these approaches, we have developed a more generalised environmental metabarcoding tool to characterise freshwater mollusc communities and initiated the development of a similar tool for the characterisation of trematode communities, in order to study the interactions between these organisms. Lastly, we discuss the integration of all these elements into new control strategies against snail-borne diseases.

**Key words:** Anthropocene, environmental DNA, environmental metabarcoding, environmental monitoring, global changes, snail-borne diseases, trematodes.

