



Le microbiote des hôtes intermédiaires escargots et des moustiques vecteurs de zoonoses sous contraintes génétiques et environnementales : une approche de la capacité vectorielle

Mathilde Jaquet

► To cite this version:

Mathilde Jaquet. Le microbiote des hôtes intermédiaires escargots et des moustiques vecteurs de zoonoses sous contraintes génétiques et environnementales : une approche de la capacité vectorielle. Parasitologie. Université de Perpignan, 2024. Français. ⟨NNT : 2024PERP0032⟩. ⟨tel-04924914v2⟩

HAL Id: tel-04924914

<https://theses.hal.science/tel-04924914v2>

Submitted on 1 Feb 2025

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.



HAL Authorization

THÈSE DE DOCTORAT

Le microbiote des hôtes intermédiaires escargots et
des moustiques vecteurs de zoonoses sous
contraintes génétiques et environnementales
Une approche de la capacité vectorielle

Présentée en vue de l'obtention grade de docteur
en **BIOLOGIE** de **L'Université de Perpignan Via Domitia**

Ecole Doctorale n°305 – Energie et Environnement

Présentée par **Mathilde JAQUET**

Dirigée par **Olivier REY**

Co-encadrée par **Thierry LEFÈVRE**

Soutenue publiquement **18 DÉCEMBRE 2024** devant le jury composé de

Mathilde GENDRIN CR, Institut Pasteur de la Guyane	Rapporteure
Tine HUYSE DR, Royal Museum for Central Africa, Belgique	Rapporteure
Géraldine LOOT PR, Université de Toulouse UMR 5174	Examinatrice
Guillaume MINARD MCF, UCBL1 CNRS 5557, UMR INRAE 1418 UMR Ecologie Microbienne	Examineur
Olivier VERNEAU PR, UPVD UMR 5110 CEFREM	Examineur
Olivier REY MCF, UPVD UMR 5244 IHPE	Directeur de thèse
Thierry LEFÈVRE DR, CNRS UMR 5290 MIVEGEC	Co-Directeur de thèse



Comité de suivi individuel

Le **comité de suivi individuel** (CSI) est déterminé par l'article 11 de [l'arrêté du 26 août 2022 modifiant l'arrêté du 25 mai 2016](#) : « *Un comité de suivi individuel du doctorant veille au bon déroulement du cursus en s'appuyant sur la charte du doctorat et de la convention de formation* ».

Le rôle du comité de suivi individuel est d'assurer un accompagnement du doctorant pendant toute la durée du doctorat au regard de la charte de la convention de formation.

Pour la préparation de cette thèse, le comité de suivi individuel a été composé de :

Christophe PAUPY DR-HDR, IRD UMR 5290 MIVEGEC	Membre spécialiste de la discipline ou en lien avec le domaine de thèse
Elodie CHAPUIS CR-HDR, IRD UMR 5290 MIVEGEC	Membre spécialiste de la discipline ou en lien avec le domaine de thèse
Marion VITTECOQ DR-HDR, Tour du Valat	Membre non-spécialiste extérieur au domaine de recherche du travail de thèse

Les comités de suivi individuel se sont déroulés :

- Le 29 septembre 2022
- Le 28 septembre 2023
- Le 04 juillet 2024

Remerciements

À l'heure où j'écris ces remerciements, ce sont trois années d'apprentissage, de nombreuses découvertes, de hauts et de bas, qui m'ont appris au moins autant sur la science que sur moi-même, qui se terminent. La finalisation de cette thèse aurait été impossible sans la contribution d'un grand nombre de personnes, qui m'ont aidée dès les premiers jours et jusqu'à aujourd'hui.

En premier lieu, je tiens à remercier mes deux directeurs, Thierry Lefèvre et Olivier Rey, sans qui cette belle aventure n'aurait pas pu se dérouler. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi en me choisissant. Vous avez tous les deux su m'encadrer avec bienveillance et m'avez rassurée et soutenue quand c'était nécessaire. J'ai beaucoup apprécié mon sujet de thèse, mais j'ai surtout aimé collaborer avec vous. Malgré vos sujets de recherche différents, vous étiez parfaitement complémentaires.

Thierry, je te suis reconnaissante de m'avoir laissé la liberté d'explorer pleinement mon sujet. Tu n'étais jamais loin et ta disponibilité et ton dévouement envers mon projet de thèse ont rendu cette expérience encore plus enrichissante grâce à nos nombreuses discussions et conseils. Ta réactivité à tous les niveaux a permis d'accélérer de nombreux processus, des démarches administratives aux corrections de posters et d'articles 'sans pinailler'. Merci également pour ta participation aux manip' du quotidien (changement de bouquets, test d'anthrone, aspirations intensives de moustiques).

Olivier, merci pour ta patience et ta pédagogie tout au long de mes travaux. Tes conseils avisés et ton soutien dans les moments de doute m'ont été d'une aide précieuse. Merci pour tout le temps que tu as réussi à m'accorder entre deux réunions, heures de cours et projets. Merci également pour cette super semaine de terrain au Bagnas et de m'avoir fait découvrir ce superbe territoire qu'est la Camargue. Merci à tous les deux de m'avoir transmis votre rigueur scientifique à toute épreuve.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse originel, Benjamin Gourbal. Merci de t'être toujours rendu disponible pour répondre à mes questions, corriger mes travaux ou m'envoyer des présentations malgré ton emploi du temps (hyper) chargé. Merci aussi pour ces petits restaurants très sympathiques testés lors d'ICOPA Copenhague.

En second lieu, j'aimerais remercier les membres de mon jury : merci à Mathilde Gendrin et à Tine Huyse d'avoir accepté d'évaluer mon travail ; ainsi qu'à Géraldine Loot, Guillaume Minard et Olivier Verneau d'avoir consacré votre temps à examiner mes travaux.

Un grand merci aux membres de mon comité de suivi de thèse : Christophe Paupy, Marion Vittecoq et Elodie Chapuis, pour vos conseils avisés, votre écoute et vos encouragements tout au long de ces trois années.

Ces travaux n'auraient pas pu avoir lieu sans le projet MICROVECT et l'initiative RIVOC de la Région Occitanie. Je tiens donc à remercier tous les acteurs de cette initiative. Je remercie également l'école doctorale 305, et plus particulièrement son président Nicolas Inguibert pour son soutien dans les divers projets menés par des doctorants.

La science est une discipline collective et ne peut se faire seule, donc merci à toutes les personnes qui ont rendu mes travaux réalisables : Carole Leray, Marion Vittecoq, Thomas Blanchon, Thomas Dagonet et les multiples volontaires pour le terrain à la Tour du Valat. Merci également à Davy Jiolle, Théo Mouillaud, Isabelle Conclois, Carole Ginibre et Bethsabée pour mes expériences au Vectopôle de l'IRD.

Plus généralement, je tiens à remercier l'ensemble du personnel des laboratoires IHPE et MIVEGEC, permanents et non-permanents, chercheurs, enseignants-chercheurs, ingénieurs, techniciens, doctorants. Pour l'IHPE, merci à Christoph de m'avoir accueillie dans l'unité. Merci à Jeff pour ta bonne humeur, tes multiples conseils avisés (j'espère atteindre ton niveau de technique un jour) et pour maintenir le labo sur pied depuis bien trop longtemps. Merci à Camille et Diane pour tous ces OM et cette gestion hyper efficace mais SURTOUT pour les nombreuses discussions à la pause-café. Merci à Anne Modat pour tous les événements organisés et ta patience face aux retards de réponses. Merci également pour ton aide dans la mise en place de mon atelier à la fête de la science. Merci à Damien pour tes multiples blagues et ton avis toujours hyper enthousiaste sur mes pâtisseries, promis, je t'en ferai encore quelques-unes avant mon départ. Merci à Olivier P. pour notre amour commun des licornes et des paillettes, de la sangria, des tartares de bœufs, de Squiz, des vidéos mignonnes de chats et de tous les trucs mignons possibles et imaginables. Cette journée lancer de haches n'aura pas été ma meilleure performance, mais on a formé une bonne équipe ! Merci à Julien P. pour les incroyables albums de thèse (même des années après avoir passé la tienne) et les superbes montages photos. Merci à David Duval pour les visites inopinées et petites discussions dans le bureau des doctorants après 18h. Merci à Antonio pour cette super semaine de terrain au Bagnas, les apéros-mollusques et tes nombreuses connaissances sur eux. Merci à la team Pilate du midi (Sarah, Annia, Anne R. et parfois Christian), ces sessions du midi terminant par le petit moment de relaxation ont été hyper importantes tout au long de cette thèse. Merci à Manon pour notre semaine de découverte de Copenhague entrecoupée de conférences. A votre échelle, vous avez rendu ma venue au labo tous les jours extrêmement plaisante, et pour cela merci. Pour MIVEGEC, merci à Frédéric Simard de m'avoir accueillie dans son unité et à toute l'équipe du BAR pour les multiples commandes et l'aide précieuse lors de l'organisation des doctoriales. Merci à Chrystelle, pour nos nombreuses discussions plus ou moins professionnelles, tes conseils précieux et les nombreux ragots

échangés. Toutes les personnes du bâtiment Païre pour leur accueil lors de mes divers séjours dans ces contrées reculées. Merci également à toutes les personnes de l'IRD qui m'ont conseillée, aidée, soutenue et guidée pendant ces trois années.

Merci aux membres des équipes TRIAD (MIVEGEC) & MIA (IHPE) pour leur accueil, toutes les discussions, partages et multiples conseils enrichissants au cours des réunions.

Merci aux doctorants IHPE partis avant moi, le duo Luc et Rémi (+ Anaïs), on ne comptera plus le nombre de Pomote, Mc Do ou de Kinder Bueno (et même de Skittles) mangés au cours de nos thèses. Merci aussi de m'avoir enseigné le principe de « la pause avant de partir », que j'ai continué d'appliquer après ton départ Luc. Surtout, n'oubliez pas de me contacter lorsque vous ouvrirez votre restaurant de spécialités américaines s'il vous plaît... Pipo, nos nombreuses discussions scientifiques (ou pas) m'auront grandement enrichie au cours de ces trois années. Lorsque j'aurai soutenu, tu auras aussi terminé ta thèse donc pense à manger et à te reposer un peu !! Je ne serai plus là pour te laisser des post-its... Philippe, d'avoir été comme un papa de thèse pour moi, m'avoir formé à l'étude des mollusques et des trématodes et d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions plus ou moins pertinentes. Léo, mon 'frère' de thèse, pour ton soutien le long de ces trois années et l'initiation à l'escalade. Tes nombreuses références à OSS117 vont me manquer. Mais aussi, aux nouveaux doctorants, Bertrand, Célia, et tous les petits stagiaires présents pour cette super soirée lancer de haches.

Merci aux doctorants de MIVEGEC, pour toutes ces pauses repas de 11h45 et goûter, mais également pour votre soutien au quotidien, en étant tous embarqués dans la même galère. Pouvoir vider son sac, échanger sur ses galères de thèse et en rire ou en pleurer, a été primordial au cours de ces trois ans. Merci au Gang MIVEGEC pour ça (Audric et Noor, les meilleurs représentants ; Margaux, Ella, Coco, Florence). Merci à Silvère, pendant longtemps le seul autre représentant de l'équipe TRIAD, fidèle au poste dans les réunions. Théo pour toutes ces superbes photos et anecdotes de voyage qui nous ont fait rêver. Merci aussi à mes anciens collègues de l'équipe de M2 : Félix, Lauryne, Hacène, Ploy. J'ai peut être changé de DS mais nos relations, elles, n'ont pas changées !

Merci à mon amie de toujours, Frédérique et mes amies de la fac, Camille, Manon et Sofia, la distance nous a peut-être éloignées mais notre amitié n'a pas bougé. Merci aussi aux copains de Villeneuve et de Montpellier pour toutes ces sorties et activités, vous avez grandement contribué à mon équilibre.

Enfin, un immense merci à mes parents, ma sœur, mon frère, Nelson évidemment et au reste de ma famille de m'avoir toujours soutenue dans cette aventure, de m'avoir laissé la liberté de trouver la voie qui me convenait, peu importe où elle se trouvait et ce qu'elle impliquait. Promis, après cette thèse, j'arrête ! Merci à ma belle-famille d'avoir supporté mes weekends/rédaction et

d'avoir toujours été hyper enthousiaste lorsque j'ai raconté mes différents projets scientifiques. Merci à tous d'avoir été si fiers de moi le jour de ma soutenance, c'est une journée que je n'oublierai jamais.

Guillaume, merci de m'avoir toujours soutenue malgré mon humeur pas toujours au top. Ta présence et ton soutien inébranlable ont été essentiels pendant ces looongues années d'étude. On va maintenant pouvoir démarrer une super nouvelle aventure !

Enfin, merci aux centaines de Bulins et *Galba* et aux milliers moustiques sacrifiés tout au long de ces travaux qui n'auraient pas pu être réalisés sans votre contribution.

J'ai probablement dû oublier des personnes dans ces remerciements et j'en suis désolée. Sachez malgré tout que je vous suis pleinement reconnaissante.

Table des matières

Introduction générale	1
I. Contexte général.....	2
II. L'émergence/réémergence	4
1) Concept d'émergence	4
2) Concept d'hôtes intermédiaires et de vecteurs	4
III. La compétence vectorielle.....	5
1) Concept.....	6
2) Facteurs influençant la compétence vectorielle.....	7
3) Paramètres clés et méthodes d'étude de la compétence vectorielle	10
IV. Microbiote : termes et concepts liés.....	13
1) Définitions et concepts	13
2) Intérêts/Rôles du microbiote	14
3) Origines possibles du microbiote.....	16
V. Le séquençage haut-débit, une technique qui a révolutionné l'étude du microbiote et des communautés complexes.....	22
VI. Triade compétence vectorielle / Facteurs biotiques (microbiome) / Facteurs abiotiques	22
VII. Modèles biologiques	24
1) <i>Aedes albopictus</i>	24
2) <i>Galba truncatula</i>	31
3) <i>Bulinus truncatus</i>	35
VIII. Problématique, objectifs et plan de la thèse	40
Chapitre 1.....	44
I. Contexte et objectifs.....	45
Publication n°1.....	47
II. Conclusion.....	104
Chapitre 2.....	107
I. Contexte et objectifs.....	108
Publication n°2.....	110
II. Conclusion.....	154
Discussion générale & perspectives.....	159
I. Modèle <i>Bulinus truncatus</i>	161
II. Modèle <i>Aedes albopictus</i>	168
III. Considérations communes aux trois modèles étudiés	172
Conclusion.....	175
Références.....	178
Annexes.....	200

I.	Productions scientifiques	201
1)	Articles scientifiques	201
2)	Posters de conférences	201
3)	Présentations orales	202
4)	Autres.....	202
5)	Articles scientifiques hors travaux de thèse	202
II.	Activités d'enseignement et d'encadrement.....	202
III.	Activités de médiation scientifique	203
IV.	Engagement associatif.....	203
Annexe n°1.....		204
Annexe n°2.....		216
Annexe n°3.....		219
Annexe n°4.....		222
Annexe n°5.....		224
Annexe n°6.....		226

Liste des figures

Figure 1 : Facteurs qui précipitent la transmission de pathogènes émergents et réémergents (traduit de (Spernovasilis <i>et al.</i> 2022))	2
Figure 2 : Illustration du concept de compétence vectorielle de l'hôte.	7
Figure 3 : Place du microbiote dans le triptyque formé par les vecteurs, les pathogènes et l'environnement	23
Figure 4 : Photo d'une femelle d' <i>Aedes albopictus</i> (Nil Rahola/IRD).....	24
Figure 5 : Cycle de vie de <i>Aedes albopictus</i> (EID Méditerranée)	25
Figure 6 : Carte de répartition d' <i>Aedes albopictus</i> en Europe (European Centre for Diseases Prevention and Control, ECDC)	26
Figure 7 : Cycle des arbovirus au sein de leur vecteur moustique (adapté de la figure de © Adrian LEUNG, John SAEKI, AFP)	27
Figure 8 : Evolution du nombre de cas mondiaux de dengue et de chikungunya de 1950 à 2023 (adapté de (Siriya-satien et al. 2018))......	29
Figure 9 : Photographie de <i>G. truncatula</i>	31
Figure 10 : Carte de répartition des <i>Galba truncatula</i> en France (source : Inventaire National du Patrimoine Naturel, 2023).	32
Figure 11 : Carte de répartition des espèces vectrices de <i>F. hepatica</i> au niveau mondial. <i>G. truncatula</i> est présente en Europe, en Afrique du Nord, et sur des foyers hyperendémiques de haute altitude dans les Andes, au Pérou et en Bolivie (Vázquez <i>et al.</i> 2023).....	32
Figure 12 : Cycle de vie de <i>Fasciola hepatica</i> (Center for Disease Control and Prevention).....	33
Figure 13 : Photographie de <i>Bulinus truncatus</i> (Infection Landscapes®).	36
Figure 14 : Cycle de vie de <i>Schistosoma haematobium</i> (Center for Diseases Control and Prevention).....	37
Figure 15 : Photo d'un couple d' <i>Aedes albopictus</i> qui s'est gorgé sur <i>Perovskia Abrotanoides</i> . A gauche, le mâle reconnaissable à ses antennes plumeuses et à sa taille inférieure et à droite la femelle.	110
Figure 16 : Photographie d'une boîte en carton, dans laquelle les moustiques infectés sont incubés (crédits : manuel d'infection expérimentale, MIVEGEC, Davy Jiolle)	172

Glossaire

Axénique : individu stérile, sans microbiote.

Dysbiose : état dans lequel le microbiote sain est perturbé.

Gnotobiotique : individu à qui l'on a associé expérimentalement des microorganismes afin de contrôler la composition du microbiote.

Microbiome : ensemble des microorganismes associés à l'environnement.

Microbiote : ensemble des microorganismes (bactéries, virus, eucaryotes uni- ou pluricellulaires appartenant aux protistes, aux champignons, aux plathelminthes...) interagissant avec un organisme à un temps t , quelle que soit la nature de ces interactions (négatives, neutres ou positives) à ce temps t .

Phylosymbiose : corrélation entre la composition d'un symbiote ou du microbiote d'un hôte et sa phylogénie.

Introduction générale

I. Contexte général

L'explosion démographique, la déforestation, les changements climatiques et la mondialisation des échanges sont autant de modifications de notre mode de vie et de notre environnement qui nous exposent à des problèmes majeurs de santé publique. En effet, tous ces éléments ont un point commun : ils favorisent les épidémies et les pandémies liées à l'émergence ou la réémergence d'agents pathogènes pour l'être humain (Wu *et al.* 2014; Semenza and Paz 2021; Baker *et al.* 2022) (**Figure 1**). Par exemple, la déforestation entraîne une augmentation des contacts entre l'humain, les animaux domestiques et la faune sauvage, favorisant ainsi les échanges potentiels de pathogènes (Afelt *et al.* 2018). De même, la mondialisation des échanges et l'explosion démographique conduisent à des interactions plus fréquentes entre les humains, augmentant le risque de transmission interhumaine de pathogènes (Priyadarsini *et al.* 2020).

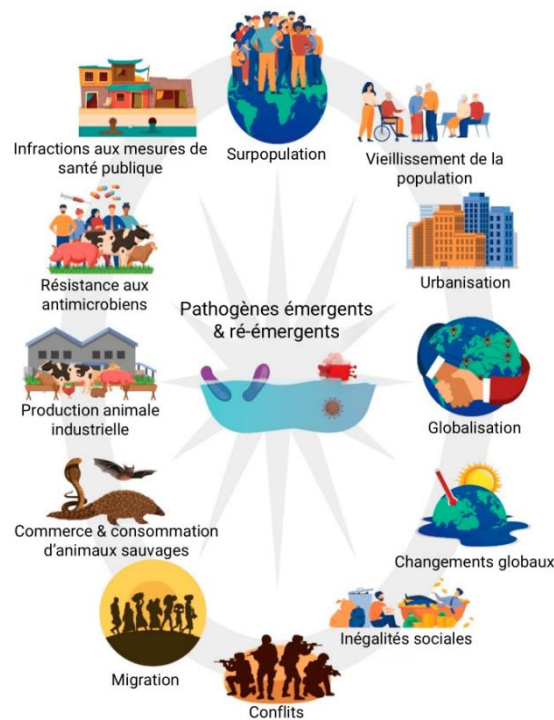


Figure 1 : Facteurs qui précipitent la transmission de pathogènes émergents et réémergents (traduit de (Spernovasilis *et al.* 2022))

Parmi les écosystèmes les plus impactés par ces changements anthropologiques et climatiques, on retrouve ceux liés à l'eau douce. En effet, ils subissent de nombreuses dégradations dues aux activités humaines telles que la pollution, la fragmentation, la surexploitation, et l'introduction d'espèces exotiques ou invasives (Dudgeon *et al.* 2006; Collen *et al.* 2014; Reid *et al.* 2019; Schmeller *et al.* 2020). Ces profondes modifications ont favorisé la transmission de nombreux pathogènes à transmission hydrique et vectorielle, tels que *Yersinia pestis* (bactérie

responsable de la peste), diverses souches de mycobactéries atypiques, le champignon *Cryptococcus neoformans*, l'amibe mangeuse de chair *Naegleria fowleri*, ou les virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, Zika et Ebola (Iii 2013; Kwon-Chung *et al.* 2014; Suntsov 2015; Alexander *et al.* 2015; Pierson and Diamond 2018; Maciver *et al.* 2020; Sene *et al.* 2024). Dans le cadre de ces travaux de thèse, je me suis intéressée à celles qui sont causées par des parasites et des virus aux cycles complexes et transmises soit par des gastéropodes (Becker *et al.* 2020; Douchet *et al.* 2023) soit par des arthropodes (da Silva Pessoa Vieira *et al.* 2022; Russell *et al.* 2023). Par exemple, la construction d'un barrage en aval du fleuve Sénégal a considérablement modifié l'écosystème du fleuve en réduisant les remontées d'eau salée, en augmentant les zones à faible débit hydrique et en limitant la migration de certains décapodes, conduisant ainsi à une explosion des populations de gastéropodes d'eau douce impliqués dans la transmission des Schistosomes (Sokolow *et al.* 2017). De plus, la pollution par les pesticides réduit les populations de prédateurs, ce qui entraîne une augmentation des populations d'escargots tolérants, augmentant ainsi le risque de transmission (Becker *et al.* 2020). De la même manière, l'usage inapproprié et excessif des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire contribue à l'émergence de pathogènes résistants (Singh *et al.* 2022). Pour les arthropodes vecteurs tels que les moustiques, l'anthropisation des milieux peut conduire à la création de niches écologiques propices au développement. Par exemple, l'urbanisation modifie les habitats naturels tout en créant des réservoirs d'eau stagnante (toits plats ou végétalisés, soucoupes des pots de fleurs, gouttières bouchées, cannettes de soda vides...) offrant des sites de reproduction idéaux pour le moustique tigre, *Aedes albopictus*, vecteur de nombreux arbovirus tels que la dengue, le chikungunya ou le zika (Unlu *et al.* 2013). En outre, la déforestation et la fragmentation des forêts conduisent à une modification des conditions climatiques et à une perte de biodiversité (et donc de prédateurs) ce qui peut conduire à une augmentation de la densité des espèces de moustiques, y compris celles vectrices d'arbovirus (da Silva Pessoa Vieira *et al.* 2022).

Je me suis intéressée à ces modèles moustiques et mollusques d'eau douce car ces derniers sont associés à des maladies infectieuses qui menacent le sud de l'Europe et notamment le Sud de la France et présentent différents degrés d'endémicité. Le gastéropode *Galba truncatula*, localement bien établi, transmet entre autres *Fasciola hepatica*, le parasite responsable de la fasciolose (Alba *et al.* 2021). Le moustique *Aedes albopictus*, introduit en Europe du Nord depuis une cinquantaine d'années et en expansion rapide dans des zones toujours plus nordiques en raison des changements globaux, est vecteur de plusieurs virus dont le chikungunya et la dengue (Garrido *et al.* 2023). Bien que les cas autochtones d'arboviroses soient encore rares en France, ces pathogènes sont émergents (Santé Publique France 2024). Enfin, des populations de gastéropodes *Bulinus truncatus*, transmetteur du parasite responsable de la bilharziose,

Schistosoma haematobium, sont désormais établies en Espagne, Italie, Grèce, Portugal et dans la plupart des îles méditerranéennes, faisant craindre des émergences de cette maladie en Europe (Simon *et al.* 1974; Martínez-Ortí, A. *et al.* 2015). Cette émergence a en réalité commencé en Corse, au cours de l'été 2013, avec des épidémies récurrentes les années suivantes dénombrant des centaines de cas d'infection endémique (Holtfreter *et al.* 2014; Noël *et al.* 2018; Rothe *et al.* 2021). L'étude de ces trois vecteurs, aux cycles parasitaires différents et qui représentent des problématiques épidémiologiques actuelles ou imminentes me permet d'avoir une vision globale de ce qu'il se passe chez les vecteurs au sens large en termes d'écologie de leur transmission.

II. L'émergence/réémergence

1) Concept d'émergence

Une maladie émergente désigne une maladie nouvelle qui apparaît dans une population pour la première fois (comme le sida à son apparition (Gilbert *et al.* 2007)) ou une maladie existante qui se propage rapidement dans une nouvelle aire géographique. Cela peut également inclure des maladies connues depuis longtemps mais dont les causes ont été récemment découvertes (comme le virus Ebola (Rojas *et al.* 2020)), ou des maladies nouvelles pour une région géographique particulière (comme la maladie de Lyme en Europe (Vandekerckhove *et al.* 2021)). Une maladie ré-émergente, quant à elle, correspond à une maladie qui avait été contrôlée ou éradiquée, mais qui réapparaît dans une population (comme la fièvre jaune en Amérique du Sud et Afrique (Gardner and Ryman 2010)).

2) Concept d'hôtes intermédiaires et de vecteurs

Dans cette thèse, nous nous intéressons aux maladies infectieuses émergentes à transmission vectorielle, impliquant la présence d'au moins une espèce vectrice dans le cycle du pathogène. Les arthropodes vecteurs d'agents pathogènes pour l'homme et l'animal comprennent les tiques, les puces, les triatomes et plusieurs espèces de diptères (moustiques, simuliés, phlébotomes, mouches tsé-tsé et culicoides). Ensemble, ils peuvent transmettre de nombreux agents pathogènes (virus, bactéries, protozoaires et nématodes), à l'origine de maladies aussi diverses que la dengue, la fièvre du Nil occidental, le Zika, le paludisme, la peste porcine africaine,

la fièvre catarrhale ovine, la trypanosomiase africaine, la leishmaniose, la maladie de Chagas, la maladie de Lyme, la filariose lymphatique, l'onchocercose et la peste. Il existe également de nombreux pathogènes de plantes à transmission vectorielle. La plupart des vecteurs de pathogènes de plantes appartiennent à l'ordre des hémiptères. Les pucerons, les aleurodes, les thrips, et les cicadelles sont les principaux vecteurs de virus végétaux, tandis que les psylles, les cicadelles et les cercopes peuvent transmettre des bactéries. Ces agents pathogènes sont responsables d'une série de maladies des plantes, notamment la jaunisse nanisante des céréales, le virus de la mosaïque du manioc, le virus de la panachure jaune du riz, le Huanglongbing des agrumes, la maladie de Pierce et la flavescente dorée de la vigne (Brown 2016).

La transmission de l'agent pathogène nécessite généralement le passage par ces vecteurs. Cependant, il existe des exceptions parmi les arbovirus, comme le virus Zika, qui peut se transmettre sexuellement (Foy *et al.* 2011) ou verticalement de la mère au fœtus pendant la grossesse ou pendant l'allaitement (Besnard *et al.* 2014; Ventura *et al.* 2016) ; ou le virus de la dengue, pour lequel de rares cas de transmission interhumaine par transfusion sanguine (Levi 2016) ou transplantation d'organes (Shaji Mathew *et al.* 2019) ont été identifiés. Lorsque nous parlerons de vecteurs de pathogènes, nous ferons référence principalement aux moustiques.

Pour les gastéropodes aquatiques, le terme est plus complexe à définir. En effet, ils sont généralement considérés comme des hôtes intermédiaires, terme désignant des êtres vivants, vertébrés ou invertébrés, dans lesquels un parasite se développe à l'état larvaire ou dans une phase d'immaturité sexuelle, tout en pouvant se multiplier. Ainsi, alors qu'un hôte intermédiaire est crucial pour le développement des stades infectieux de l'agent pathogène sans le transmettre activement, un vecteur, quant à lui, transmet activement un pathogène d'un hôte à un autre.

Cependant, il n'existe actuellement aucun consensus dans la littérature, d'où l'importance de toujours définir les termes employés (Wilson *et al.* 2017). Dans ces travaux de thèse, nous parlerons de compétence vectorielle pour tous les modèles étudiés. Ainsi, nous considérons que les gastéropodes sont également des vecteurs, mais dans un sens plus large que les moustiques. En effet, tout organisme qui transporte et transmet un pathogène ou un parasite d'un hôte à un autre contribue à la propagation des maladies. Cette définition inclut les vecteurs directs (qui transmettent directement des pathogènes aux humains ou aux animaux), ainsi que les hôtes intermédiaires (qui transportent des pathogènes pendant une partie de leur cycle de vie avant que le pathogène n'atteigne son hôte définitif).

III. La compétence vectorielle

1) Concept

La compétence vectorielle d'un hôte a longtemps été définie comme la capacité intrinsèque d'un arthropode à acquérir, maintenir et transmettre avec succès un agent pathogène à un hôte. Il s'agit de la capacité physiologique et génétique du vecteur à assurer le développement, la réplication ou la survie de l'agent pathogène et, en fin de compte, à le transmettre. Cela soulève la question de savoir pourquoi certains vecteurs (espèces, populations, individus) peuvent résister à l'infection par un pathogène, tandis que d'autres y sont vulnérables, permettant ainsi la propagation de la maladie. Cette compétence vectorielle est un trait complexe qui résulte de nombreux traits associés à la physiologie, à l'immunologie et au métabolisme des vecteurs (Hardy *et al.* 1983) (**Figure 2**).

Plus récemment, cette définition a été remise en question car, en se focalisant uniquement sur la capacité intrinsèque du vecteur, elle tend à négliger l'influence cruciale d'autres acteurs tels que le pathogène lui-même et l'environnement. En effet, la compétence vectorielle représente le degré de compatibilité ou de coadaptation entre la population du pathogène et celle du vecteur. Il s'agit d'un trait co-évolué, c'est-à-dire un phénotype partagé par l'hôte et son parasite, combinant la capacité d'infectivité du pathogène et la susceptibilité / résistance du vecteur. En résumé, comme tout trait phénotypique lié à la transmission (Lefevre *et al.* 2018), la compétence est le résultat de l'interaction entre le génotype du vecteur, celui du pathogène et l'environnement (Compétence = $G_v \times G_p \times E$).

La compétence est donc propre à un système biologique, susceptible de variation dès que l'un des deux partenaires concernés change. Ainsi, un même vecteur pourra être compétent pour une espèce voire une souche/génotype de pathogène mais être réfractaire à l'infection par une autre espèce ou souche/génotype. En effet, la compétence hôte/pathogène existe à l'échelle individuelle, populationnelle et spécifique pour chacun des protagonistes.

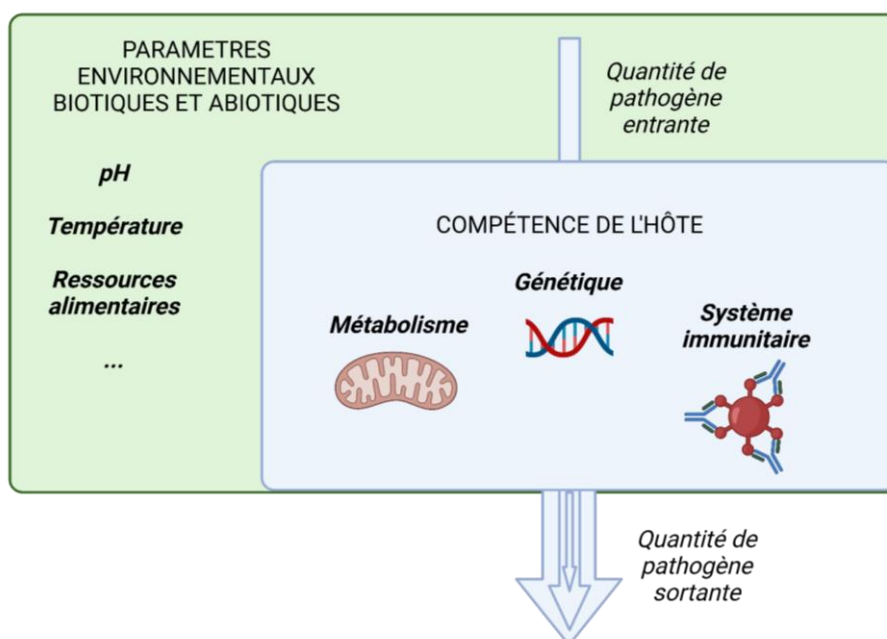


Figure 2: Illustration du concept de compétence vectorielle de l'hôte.

Pour avoir une émergence de maladie infectieuse associée à un pathogène donné, la présence d'un vecteur compétent dans l'environnement est donc essentielle. Ce dernier est donc défini non seulement par sa capacité à être infecté par le pathogène, mais aussi par sa faculté à l'amplifier jusqu'à un niveau permettant sa transmission à d'autres hôtes (Martin *et al.* 2016).

2) Facteurs influençant la compétence vectorielle

Cette compétence n'est pas un trait fixé et présente un certain degré de plasticité en fonction de l'environnement biotique et abiotique et des caractéristiques de l'hôte et du pathogène. En effet, la température, la ressource alimentaire, la photopériode, ou la composition du microbiote sont des facteurs qui influencent fortement le développement du pathogène et l'activité immunitaire, le métabolisme, et donc la compétence des hôtes à des agents pathogènes (Richards *et al.* 2010; Muturi *et al.* 2012; Lefèvre *et al.* 2013; van Munster 2020; Lewis *et al.* 2023).

a. Chez les vecteurs moustiques

De très nombreuses études sur les aspects génétiques, moléculaires, cellulaires et physiologiques ont été menées ces dernières années pour examiner la réponse immunitaire des moustiques aux agents pathogènes (Viglietta *et al.* 2021; Lewis *et al.* 2023). Ces recherches ont révélé plusieurs mécanismes impliqués dans la prévention ou la limitation du développement des

parasites, tels que les voies RNAi, Toll, IMD, Jak-Stat et la production de peptides anti-microbiens. Elles ont permis d'acquérir une connaissance approfondie des mécanismes génétiques et moléculaires sous-jacents à la compétence des moustiques face aux agents pathogènes, tout en mettant en lumière des interactions génétiques complexes entre le vecteur et le parasite. L'issue de l'infection dépend ainsi de ces interactions spécifiques entre les génotypes du vecteur et du parasite (Lambrechts 2010). Par exemple, il a été démontré que la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* pour le virus du chikungunya varie en fonction d'interactions entre les génotypes du moustique et celui du virus (Vega-Rúa *et al.* 2020). Chez *Ae. aegypti*, la charge virale du virus de la dengue est également fortement influencée par la génétique des vecteurs (Novelo *et al.* 2023). En outre, la susceptibilité d'*Ae. aegypti* vis-à-vis du nématode *Brugia malayi* est sous le contrôle d'un gène unique, lui-même modulé par d'autres gènes (Failloux *et al.* 1999).

En comparaison avec les efforts consacrés à l'étude moléculaire et physiologique de la compétence des moustiques, relativement peu de recherches se sont intéressées au contexte écologique dans lequel cette compétence s'exprime et a évolué. Au-delà des facteurs génétiques, l'éco-immunologie (Schulenburg *et al.* 2008) révèle que les facteurs abiotiques et biotiques jouent un rôle clé dans la modulation des interactions hôte-pathogène. Bien que ces interactions aient une importance épidémiologique cruciale, la compréhension des effets environnementaux sur la compétence vectorielle reste encore à ses prémices.

En premier lieu, la température est un facteur fondamental car les moustiques sont ectothermes (Mordecai *et al.* 2019). C'est-à-dire qu'ils ne produisent pas de chaleur interne mais dépendent de sources extérieures de chaleur pour augmenter leur température. Ainsi, leur développement, leur survie, et leur réponse immunitaire dépendent largement de la température ambiante (Murdock *et al.* 2012; Christiansen-Jucht *et al.* 2014; Grigaltchik *et al.* 2016; Ezeakacha and Yee 2019). Il a été démontré dans le système *Aedes*/arbovirus, par exemple, que plus la température était élevée, plus la période d'incubation extrinsèque était courte et donc plus les virus se développent rapidement dans leur vecteur (Murrieta *et al.* 2021). Néanmoins ceci n'est vrai que jusqu'à une certaine température au-delà de laquelle la compétence diminue (Murrieta *et al.* 2021). De plus, cet effet de la température varie en fonction de l'espèce et de la souche virale, de la dose inoculée, de l'espèce et de la population de moustiques (Murrieta *et al.* 2021).

Un autre paramètre important, capable de modifier cette compétence vectorielle, est la ressource alimentaire à disposition. En effet, la quantité et la qualité des ressources alimentaires acquises par les moustiques, depuis leur stade larvaire jusqu'à l'âge adulte influencent leur survie, leur fécondité, leur capacité de vol et leur susceptibilité aux agents pathogènes (Carvajal-Lago *et al.* 2021). Ces effets du régime alimentaire sur la compétence vectorielle peuvent être liés à des effets directs sur le développement du pathogène tels que des métabolites secondaires toxiques

(Hien *et al.* 2021); mais également à des effets indirects au travers de la valeur nutritionnelle qui pourrait en retour affecter l'immunité de l'hôte (Yan *et al.* 2023). Plusieurs études se sont concentrées sur l'impact de la nutrition larvaire sur la compétence vectorielle des adultes (Moller-Jacobs *et al.* 2014; Vantaux *et al.* 2016b, a; Barreaux *et al.* 2016; Linenberg *et al.* 2016). Par exemple, un stress alimentaire subit au stade larvaire chez *Ae. aegypti* (Muturi *et al.* 2011) peut mener à une augmentation de la compétence pour le virus Sindbis : les larves élevées dans des conditions de stress nutritionnel donnent des adultes plus sensibles à l'infection lorsqu'elles sont exposées à des agents pathogènes. Ces larves investissent le peu d'énergie disponible dans la survie et le développement au dépend de la réponse immunitaire.

Chez les adultes, des études suggèrent que le régime alimentaire sucré des moustiques peut effectivement influencer leur immunocompétence et leur compétence pour les agents pathogènes (Ferguson and Read 2002; Lambrechts *et al.* 2006; Almire *et al.* 2021; Yan *et al.* 2023). Ces études se sont concentrées sur des changements quantitatifs (c'est-à-dire différentes concentrations de solutions sucrées), et non qualitatifs, du régime alimentaire. À notre connaissance, une seule étude a examiné l'impact d'un type de sucre spécifique, démontrant que l'allose peut limiter le développement d'un parasite murin de la malaria chez le moustique *Anopheles stephensi* (Mizushima *et al.* 2023). Cette étude, tout comme les précédentes, s'est appuyée sur des sources de sucre commerciales artificielles, telles que le saccharose, le glucose ou l'allose. Pourtant, les moustiques femelles ingèrent, tout comme les mâles, des sucres provenant d'un large éventail d'espèces végétales en plus des repas sanguins (Foster 2022). En conditions de laboratoire, il a été démontré que selon l'espèce de fleur sur laquelle *An. coluzzi* se nourrit, elle est plus ou moins intensément infectée par *Plasmodium falciparum* (Hien *et al.* 2016). Les auteurs émettent l'hypothèse que ces effets seraient liés à une conjonction de métabolites secondaires végétaux et de qualité nutritionnelle de la plante. L'influence de la diversité naturelle des plantes sur la compétence des moustiques pour les pathogènes demeure largement inexplorée, en particulier au sein des interactions *Aedes*-arbovirus.

D'autres paramètres environnementaux tels que la présence de différents types de polluants peuvent modifier la compétence vectorielle des moustiques. Par exemple, l'exposition de larves d'*Ae. aegypti* au malathion, un insecticide organophosphoré largement utilisé en agriculture et par les particuliers conduit à une augmentation de la compétence vectorielle des adultes pour l'arbovirus Sindbis (Muturi and Alto 2011). A l'inverse, l'exposition d'adultes *An. gambiae* à l'insecticide bendiocarbe (carbamates) réduit la prévalence et l'intensité de l'infection à *P. falciparum*. Néanmoins, ces résultats sont différents selon que l'on se trouve en présence d'une souche de moustiques résistante ou sensible aux insecticides (Alout *et al.* 2014). Enfin, l'exposition d'*Ae. albopictus* adultes à la bifenthrine augmente leur compétence vectorielle pour le

virus Zika mais diminue celle du virus de la dengue (Richards *et al.* 2017). Dans tous les cas, ces différents articles tous menés en conditions de laboratoires n'arrivent pas aux mêmes conclusions mais montrent que l'exposition à des insecticides, à priori déjà présents dans l'environnement, peut modifier la compétence vectorielle des moustiques.

De la même manière, le microbiote des hôtes va jouer un rôle crucial qui sera détaillé dans la partie concernée.

b. Chez les hôtes intermédiaires mollusques

Chez les gastéropodes, la ressource alimentaire peut également avoir un effet majeur sur la compétence. En effet, le développement des sporocystes de *Schistosoma* dépend de la quantité et de la qualité des ressources alimentaires acquises par l'hôte escargot. Il existe une relation positive entre l'acquisition de ressources par les escargots infectés et leur compétence. Ainsi, il a été démontré expérimentalement qu'une augmentation de 24 fois du taux d'approvisionnement en ressources multiplie jusqu'à 60 fois la production de cercaires de *S. mansoni* par individu *B. glabrata* infecté (Civitello *et al.* 2018). De la même manière, le fait de nourrir expérimentalement des *G. truncatula* avec de la nourriture pour poisson d'aquarium (Tetraphyll), en plus de la laitue souvent utilisée pour l'élevage de cette espèce en laboratoire, entraîne une augmentation significative de la prévalence d'infection à *Fasciola hepatica* (Rondelaud *et al.* 2004) ainsi que du nombre de cercaires libérés (Belfaiza *et al.* 2004).

En outre, la pollution par des produits agrochimiques impacte la compétence vectorielle des mollusques hôtes intermédiaires de différentes manières. En effet, ces produits sont capables d'affecter les populations d'escargots parfois négativement en augmentant leur mortalité et parfois positivement en diminuant leurs prédateurs ou leur ressource alimentaire (Halstead *et al.* 2018; Rumschlag *et al.* 2019). Ces produits peuvent également avoir des effets directs sur les parasites.

Enfin, des facteurs intrinsèques à l'hôte tels que la génétique jouent également un rôle crucial dans cette compétence. Par exemple, de nombreuses études ont montré que la compatibilité entre une souche de *Schistosoma* et une souche de *Biomphalaria* dépendait en grande partie de facteurs génétiques (Oliveira *et al.* 2008; Mitta *et al.* 2012; Galinier *et al.* 2017). C'est également le cas chez *B. truncatus* (Rollinson *et al.* 2001). De la même manière, chez *G. truncatula*, l'infection par une souche sympatrique de *F. hepatica* conduit à un plus fort taux d'infection du fait d'une meilleure compatibilité (Vázquez *et al.* 2021).

3) Paramètres clés et méthodes d'étude de la compétence vectorielle

La compétence vectorielle est un trait que l'on peut quantifier en calculant le ratio entre le nombre de propagules infectieuses produites par l'hôte et le nombre de propagules qui a initialement infecté cet hôte (Merrill and Johnson 2020).

Il convient de distinguer deux types de compétences vectorielles : celle observée sur le terrain de celle caractérisée, au laboratoire, en conditions contrôlées. La première consiste à échantillonner des individus dans la nature et à caractériser leur compétence *in natura* alors que la seconde passe par des infections expérimentales. Cette distinction est cruciale pour mieux appréhender la complexité des dynamiques écologiques des interactions hôte-pathogène.

La compétence vectorielle peut être évaluée par deux traits principaux : le taux d'infection et l'intensité de l'infection. Le taux d'infection ou prévalence, correspond au nombre d'hôtes infectés par un ou plusieurs individus d'une espèce de parasite particulière (ou d'un groupe taxonomique) divisé par le nombre d'hôtes examinés pour ce groupe de parasites. L'intensité moyenne est le nombre moyen de parasites dans les hôtes infectés (Bush *et al.* 1997).

Dans le cadre des infections expérimentales de moustiques avec des arbovirus, plusieurs traits complémentaires peuvent être distingués et mesurés autour de ces deux traits principaux : le taux d'infection, le taux de dissémination, l'efficacité de dissémination, le taux de transmission et l'efficacité de transmission (Gu *et al.* 2008; Kramer and Ciota 2015; Pereira-dos-Santos *et al.* 2020). Le taux d'infection correspond au nombre de moustiques ayant un corps positif en qPCR pour l'ARN viral, par rapport au nombre total de moustiques ayant pris un repas sanguin infectieux (prévalence). Le taux de dissémination est évalué par le nombre de moustiques ayant de l'ARN viral détecté dans la tête (ou les pattes ou les ailes), par rapport au nombre de moustiques ayant un corps positif en qPCR. L'efficacité de dissémination correspond au nombre de moustiques ayant de l'ARN viral détecté dans la tête (ou les pattes ou les ailes), par rapport au nombre total de moustiques testés. Pour chacun de ces traits de prévalence, on peut également caractériser l'intensité chez les individus positifs grâce, par exemple, aux valeurs de Ct (cycle de seuil) des qPCR qui correspond à l'intersection entre une courbe d'amplification et une ligne de seuil. Cela correspond à une mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de PCR. Une valeur basse de Ct indique que l'ARN viral a été amplifié plus rapidement au-dessus du seuil, ce qui signifie que l'échantillon contenait une plus grande quantité d'ARN viral. Enfin, le taux de transmission peut être évalué soit par qPCR sur les glandes salivaires disséquées, soit par salivation et titrage infectieux des salives. Le taux de transmission est alors défini comme le nombre de moustiques ayant des particules virales infectieuses actives dans leur salive, par rapport au nombre total d'individus qui avaient une tête positive en qPCR. L'efficacité de transmission est définie comme le nombre de moustiques ayant des particules virales infectieuses

actives dans leur salive, par rapport au nombre total d'individus testés. L'intensité de transmission est calculée comme le nombre moyen de particules virales par condition.

Chez les mollusques, la compétence vectorielle est évaluée par la prévalence et l'intensité de l'infection. La prévalence, qui correspond au nombre de mollusques infectés dans la population étudiée, peut être mesurée de plusieurs manières. Premièrement, par l'émission cercarienne (Nwoko *et al.* 2021). Une fois que les miracidia ont pénétrés dans le mollusque, ils s'y développent pendant une plus ou moins longue période : la période de prépatence. A la fin de cette période de prépatence, et une fois mature, les cercaires sont libérées dans l'eau environnante. Dans les trématodiasés étudiées dans cette thèse, les cercaires sont majoritairement émises pendant la journée, sous la lumière du soleil. En laboratoire, ce processus peut être reproduit en exposant un escargot infecté à une lumière suffisamment intense pour stimuler la libération des cercaires. Pour ce faire, les mollusques échantillonnés sont rincés et isolés dans des puits de plaques remplis d'eau à température ambiante, et exposés à une source de lumière pour stimuler la libération des cercaires potentielles. Après une à quelques heures d'exposition, le puits est observé à la loupe binoculaire pour détecter et compter les cercaires. Théoriquement, si l'escargot n'a pas émis, il faut continuer ce processus pendant toute la période théorique de prépatence spécifique à chaque espèce de trématode pour vérifier s'il émet ou non. L'absence d'émission cercarienne après 4 semaines indique que l'escargot n'était pas infecté soit parce qu'il n'a pas rencontré de parasites, soit parce qu'il est non compétent. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter beaucoup de matériel coûteux. Cependant, il n'existe pas de protocole harmonisé concernant la durée d'exposition à la lumière ni sur la durée pendant laquelle il faut continuer si l'escargot n'émet pas. De plus, elle manque de sensibilité. En effet, si aucune cercaire n'est émise, cela ne signifie pas nécessairement que le mollusque est sain ; les cercaires peuvent ne pas avoir atteint le stade approprié pour être libérées ou les conditions de température et de lumière peuvent ne pas être idéales (Kariuki *et al.* 2004). De plus, l'identification morphologique des cercaires nécessite un haut niveau d'expertise (Nasir and Erasmus 1964) et peut nécessiter des techniques d'identification moléculaires. Enfin, il faut être capable de maintenir les escargots en vie tout le long de l'émission, ce qui peut parfois s'avérer compliqué. Cette technique d'émission cercarienne peut donc conduire à une prévalence sous-estimée. Il existe d'autres techniques dites conventionnelles qui consistent à (i) écraser les escargots et isoler les sporocystes secondaires afin de libérer et compter les rédies ou les cercaires (Farghaly *et al.* 2016) ; (ii) à extraire les escargots de leur coquille et les écraser dans de l'eau pour récupérer les cercaires (Chu and Dawood 1970; Wiroonpan *et al.* 2021); (iii) à disséquer les escargots et fixer les tissus pour les observer au microscope ou à la loupe binoculaire à la recherche de stades parasitaires en cours de développement (Tucker *et al.* 2014).

En parallèle des techniques conventionnelles, la PCR peut être utilisée pour identifier le nombre de mollusques contenant de l'ADN parasitaire, établissant ainsi une prévalence moléculaire. Cependant, en raison de sa sensibilité, la PCR peut amplifier l'ADN parasitaire résiduel d'un parasite mort provenant d'une infection ancienne ou d'un parasite qui vient juste d'infecter le mollusque et qui n'est pas encore au stade de libération des cercaires, et est sensible aux contaminations, créant des faux positifs. Elle est également sujette aux inhibitions liées soit à la présence d'inhibiteurs, soit à une trop grande quantité d'ADN, créant des faux négatifs (Nwoko *et al.* 2021). Pour contrer ce problème, il est possible d'ajouter un contrôle interne dans la PCR. Si ni le contrôle interne ni la bande correspondant au trématode n'apparaissent sur le gel d'agarose, cela signifie que la PCR a été inhibée. Il faut alors diluer l'échantillon pour limiter l'inhibition. Si seul le contrôle interne apparaît, cela signifie que le mollusque est bien négatif (Schols *et al.* 2019). Cependant, l'ajout d'un contrôle interne complique la réaction PCR en augmentant le risque d'hybridation entre les amorces (Caron *et al.* 2008).

L'intensité, qui correspond au nombre de parasites présents dans chaque mollusque, peut être évaluée de deux manières : soit par le comptage du nombre de parasites émis par le mollusque, ce qui est extrêmement chronophage, soit par qPCR. La qPCR, bien que sensible, peut également conduire à des faux positifs en raison de la présence de 'restes' de parasites issus d'une infection ancienne et est également sujette aux contaminations.

Ainsi, il n'existe aucune technique parfaite pour évaluer la compétence vectorielle des mollusques issus du milieu naturel. Toutes ont leurs avantages et inconvénients dont il faut être conscient quand on les emploie.

IV. Microbiote : termes et concepts liés

Les deux sections précédentes de ce manuscrit ont montré que l'émergence et la réémergence d'une maladie infectieuse reposent sur deux éléments essentiels : la présence en quantité suffisante d'un hôte compétent pour le pathogène. Cette compétence peut être influencée par divers facteurs, dont certains sont cruciaux. Parmi ces facteurs, le microbiote des hôtes joue un rôle important.

1) Définitions et concepts

Le microbiote peut être défini comme l'ensemble des communautés de microorganismes (bactéries, archées, eucaryotes uni- ou pluricellulaires appartenant aux protistes, virus et

champignons) associées à un environnement, un organisme ou même un organe donné (Marchesi and Ravel 2015). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés exclusivement au microbiote bactérien. De plus, il convient ici de distinguer le microbiote des hôtes du microbiome environnemental.

Le microbiote est devenu un sujet de grande importance ces dernières années. Depuis 2012, avec la popularisation des techniques de séquençage, le nombre de publications sur ce thème a considérablement augmenté. Par exemple, le nombre d'articles sur PubMed est passé de 82 en 2000 à 2276 en 2012, et à 16 484 en 2024. De nombreux microbiotes d'hôtes divers ont ainsi été caractérisés, y compris ceux d'*Ae. albopictus*, de *B. truncatus* et de *G. truncatula*.

Cependant, l'origine et les facteurs modulant ces microbiotes restent peu étudiés dans la plupart des modèles. Le microbiote peut être influencé par divers facteurs environnementaux, biotiques et abiotiques, tels que l'alimentation et le microbiome environnemental, lui-même affecté par les conditions locales (Díaz-Sánchez *et al.* 2018; Chang and Kao 2019; Luo *et al.* 2021). De plus, des facteurs intrinsèques à l'hôte, comme sa génétique, jouent également un rôle crucial.

2) Intérêts/Rôles du microbiote

Il est désormais bien établi que le microbiote joue un rôle fondamental dans la biologie des organismes, influençant une multitude de fonctions vitales de l'hôte. En effet, il impacte des aspects aussi divers que le développement, la physiologie, la reproduction, le comportement, le métabolisme et l'immunité (Liberti and Engel 2020; Daisley *et al.* 2020; Yuan *et al.* 2021). Ceci est vrai à la fois pour les vertébrés et les invertébrés.

Concernant le métabolisme, chez l'ours brun (*Ursus arctos*), la composition du microbiote est modifiée entre les périodes estivale et hivernale. Le microbiote estival permet aux ours de stocker des graisses afin de gérer l'homéostasie énergétique en hiver (Sommer *et al.* 2016). Ceci est également vrai chez le modèle murin (souris C57BL/6), qui une fois qu'il est exposé au froid, voit son microbiote se modifier amplement. Si ce « microbiote du froid » est transféré à un individu axénique, ce dernier voit son métabolisme se modifier pour augmenter sa tolérance au froid en augmentant sa dépense énergétique et sa perte des graisses (Chevalier *et al.* 2015). Chez *Lymnea stagnalis*, un mollusque d'eau douce, une perturbation du microbiote par des concentrations croissantes d'antibiotique peut altérer la mémoire et modifier le comportement et le métabolisme (Davidson *et al.* 2024). En effet, un test d'acquisition de la mémoire est réalisé en présence ou en absence de concentrations croissantes d'antibiotiques. Le test consiste à associer la consommation de jus de carotte à un stimulus aversif. Les escargots au microbiote sain évitent

davantage le jus de carotte après le test comportemental. À l'inverse, ceux exposés à de fortes concentrations d'antibiotiques, et donc avec un microbiote perturbé, n'établissent pas l'association entre le jus de carotte et le stimulus aversif. Les auteurs montrent que l'altération du microbiote affecte les voies métaboliques microbiennes qui sont cruciales pour la formation de la mémoire chez ce mollusque. Chez la drosophile, le microbiote est capable de modifier les besoins en vitamines et nutriments en fonction du régime alimentaire dont dispose l'insecte (Wong *et al.* 2014). Enfin, chez le moustique *An. coluzzii*, un traitement antibiotique peut perturber diverses fonctions métaboliques dont le cycle de l'acide tricarboxylique et de l'azote tout en diminuant considérablement la quantité totale de bactéries (Chabanol *et al.* 2020). Chez *An. stephensi*, une perturbation du microbiote liée à des antibiotiques peut conduire à l'accumulation de certains métabolites tels que le tryptophane ou la 3-hydrokynurénine, ce qui conduit à une augmentation de l'infection par *Plasmodium berghei* (Feng *et al.* 2022).

Concernant le lien entre microbiote et immunité, chez l'abeille européenne (*Apis mellifera*), un des membres du microbiote, *Frischella perrara*, est capable de provoquer une hyper activation du système immunitaire de l'hôte en stimulant l'expression de récepteurs de reconnaissance de peptides antimicrobiens (Emery *et al.* 2017). Chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), une exposition précoce à des bactéries environnementales permet une reprogrammation de l'expression des gènes immunitaires qui conduit à une protection immunitaire à long terme et intergénérationnelle contre l'OSHV-1, un virus qui touche les huîtres (Fallet *et al.* 2022). Chez le moustique *Ae. aegypti*, certains membres du microbiote sont capables de faire du priming immunitaire en promouvant l'expression de gènes immunitaires. C'est le cas par exemple des *Proteus sp.* qui permettent d'activer la réponse immunitaire contre le virus de la dengue (Ramirez *et al.* 2012). Chez les moustiques du genre Anophèles, DUOX est une NADPH oxydase qui conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène. Dans le but d'induire une tolérance du système immunitaire pour le microbiote de l'hôte, cette enzyme peut de se combiner avec une hème peroxydase pour réduire l'induction d'une réponse immunitaire contre le microbiote intestinal. Néanmoins, ceci a aussi pour effet de limiter la réaction immunitaire contre de potentiels pathogènes type *Plasmodium* (Rodgers *et al.* 2017a; Romoli and Gendrin 2018). L'exposition d'*An. gambiae* aux antibiotiques Pénicilline et Streptomycine peut augmenter la susceptibilité des moustiques à l'infection par *Plasmodium* en perturbant leur microbiote (Gendrin *et al.* 2015). Enfin, l'exposition d'*An. coluzzii* à divers antibiotiques peut conduire à une augmentation ou à une diminution de l'infection par *Plasmodium*. Ainsi, suite à un traitement par de l'Azithromycine ou du Cotrimoxazole, on assiste à une diminution de la charge parasitaire, alors qu'avec de la Doxycycline, cette dernière augmente (Gendrin *et al.* 2016).

Étant donné que le microbiote peut influencer le métabolisme et l'immunité, il joue également un rôle crucial dans les interactions hôtes-pathogènes. En effet, son impact sur la compétence vectorielle a été démontré chez divers modèles d'arthropodes, tels que les moustiques, les phlébotomes, les glossines et les tiques, modifiant ainsi leur capacité à transmettre des pathogènes (Farikou *et al.* 2010; Gall *et al.* 2016; Louradour *et al.* 2017; Gao *et al.* 2019; Yin *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2024). L'exemple le plus connu est celui de la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* qui, chez les moustiques, empêche la transmission du virus de la dengue (Carrington *et al.* 2018; Flores *et al.* 2020). Des communautés microbiennes plus complexes peuvent également être associées à des différences de susceptibilité des hôtes. Par exemple, *Enterobacter* dans l'intestin moyen du moustique produit des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent tuer les parasites *Plasmodium* (Boissière *et al.* 2012; Dennison *et al.* 2016), tandis que les moustiques dépourvus de leurs bactéries intestinales Gram-négatives sont plus susceptibles à l'infection par *Plasmodium* (Noden *et al.* 2011). Chez les glossines, *Wigglesworthia* déclenche des réponses immunitaires antibactériennes contre les trypanosomes (Farikou *et al.* 2010), tandis que les microbiomes intestinaux des phlébotomes favorisent l'infection par *Leishmania* (Louradour *et al.* 2017). En somme, le microbiote est un acteur clé de la santé et du bien-être des organismes, jouant un rôle indispensable dans le maintien de l'équilibre biologique et la protection contre les maladies. C'est pourquoi, il suscite un tel intérêt dans les études, notamment dans le contexte des interactions vecteur/parasite.

Cependant, de nombreuses zones d'ombre subsistent quant à l'origine, la dynamique (structure spatiale et temporelle), la transmission, ainsi que le rôle et les fonctions du microbiote. De plus, il existe des biais de connaissances significatifs selon les groupes taxonomiques.

3) Origines possibles du microbiote

De manière générale, le microbiote peut être acquis au moyen de deux types de mécanismes qui ne sont pas mutuellement exclusifs. Premièrement, les processus déterministes sont prédictibles et répétables. Ils comprennent : la sélection par les conditions environnementales et les facteurs liés à l'hôte, la compétition entre bactéries qui va conduire à la dominance de certaines espèces ou encore le mutualisme qui favorise la croissance de certaines communautés spécifiques. Outre ces processus déterministes, la composition du microbiote est également sous l'influence de processus stochastiques comprenant la dispersion (ou mouvement aléatoire de bactéries d'un environnement à l'autre), la dérive (fluctuations aléatoires de communautés liées à des événements fortuits) ou la mutation (changements génétiques aléatoires

qui peuvent conduire à de nouvelles souches microbiennes). En général, ces deux types de processus façonnent ensemble le microbiote.

a. Application aux moustiques

Pour le moustique, le microbiote est en partie conditionné par la génétique. En effet, une équipe s'est intéressée aux variations saisonnières du microbiote de diverses espèces de moustiques issues des genres *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Coquilletidia*, *Culex* et *Anopheles* (Novakova *et al.* 2017). Toutes les espèces analysées présentaient des microbiotes différents. Ces différences étaient d'abord expliquées par le background génétique des individus, témoins d'une phylosymbiose.

L'autre facteur qui joue sur la composition du microbiote des moustiques est l'environnement. En effet, au stade adulte, des individus *Ae. albopictus* originaires de La Réunion et de Montpellier, élevées dans les mêmes conditions de laboratoire, ne présentent pas de différences dans leurs communautés microbiennes. Cela pourrait indiquer que les différences observées habituellement ne sont pas dues à la génétique des hôtes mais plutôt à l'environnement dans lequel ils sont élevés. Cependant, cette étude ne s'est intéressée qu'au microbiote des adultes directement après émergence et n'a pas comparé les communautés des stades larvaires qui sont plus complexes que les communautés des adultes (Minard *et al.* 2018). Une autre étude réalisée par Bogale et collaborateurs, a évalué la contribution de divers facteurs tels que la résistance aux insecticides, l'origine du repas sanguin, ou la présence de parasites eucaryotes et de virus, par rapport à la génétique (espèce, génotype) de diverses espèces d'*Anophèles* capturées sur le terrain en Guinée et au Mali (Bogale *et al.* 2020). Les résultats ont révélé que le seul facteur influençant la composition du microbiote des moustiques était leur lieu de capture, et non l'espèce présente. Des résultats similaires ont été obtenus par (Muturi *et al.* 2018) qui ont constaté que le microbiote de moustiques appartenant aux genres *Anophèles*, *Culex* et *Aedes* capturés à diverses localisations aux États-Unis dépendait également du lieu d'échantillonnage.

Parmi les facteurs environnementaux qui influencent le microbiote, on trouve notamment la diète/le régime alimentaire. De nombreuses recherches ont été menées sur l'acquisition du microbiote au stade larvaire (Dickson *et al.* 2017; Zouache *et al.* 2022). A ce stade, les larves sont aquatiques et se nourrissent de détritus organiques, d'algues et de microorganismes procaryotes présents dans l'eau. Il a été démontré qu'une partie des bactéries contenues dans ces différents compartiments était retrouvée dans les larves qui avaient probablement été colonisées au travers de l'alimentation (Minard *et al.* 2013b; Coon *et al.* 2016; Strand 2018). En effet, si on stérilise l'extérieur des œufs et qu'on élève les larves en conditions stériles, les larves n'ont plus aucune bactéries (Coon *et al.* 2014). Les moustiques adultes conservent certaines bactéries acquises au

stade larvaire, mais, à l'émergence, leur microbiote est moins complexe. Cela s'explique par la formation de deux membranes péritrophiques méconiales qui séquestrent et excrètent une partie des bactéries ingérées pendant le stade larvaire, stérilisant ainsi partiellement l'intestin moyen. Ce processus, bien documenté chez *Ae. aegypti*, est moins étudié chez *Ae. albopictus*. Suite à cette stérilisation partielle, les adultes modulent leur microbiote au travers de leur alimentation. En effet, il a été démontré que les microbiotes des femelles (hématophages et phytophages) ne sont pas dominés par les mêmes communautés que les mâles (exclusivement phytophages) (Minard *et al.* 2013b, a). De la même manière, des femelles nourries sur repas végétaux et des femelles nourries sur repas sanguin détiennent des microbiotes différents l'un de l'autre (Yadav *et al.* 2016). Ainsi, l'alimentation du moustique adulte peut influencer son microbiote (Guégan *et al.* 2018; Schrieke *et al.* 2022; Seabourn *et al.* 2023). Il a même été démontré que, le type de repas (de sang ou de jus sucré) influençait la composition du microbiote de façon à optimiser la digestion (Salgado *et al.* 2024).

i. Influence des repas sucrés sur le microbiote

Chez des souches de laboratoire d'*Ae. aegypti* nourries sur solution de sucrose 10%, l'alpha diversité bactérienne calculée par l'indice de Simpson est supérieure à celle des femelles nourries sur sang et la composition est plus variée avec moins de taxons dominants (Salgado *et al.* 2024). Ainsi, le microbiote des femelles nourries sur sucre diffère de celui des femelles nourries sur sang.

Certains composants du microbiote ont été associés à une augmentation de la capacité à digérer le fructose chez *Ae. albopictus* (Scolari *et al.* 2019). Par exemple, la famille des *Enterobacteriaceae* montre la plus grande activité lorsqu'on nourrit les moustiques avec une solution de fructose, indépendamment du sexe des individus (Guégan *et al.* 2020). Cette famille avait déjà été identifiée comme capable de dégrader une large gamme de polysaccharides, y compris le glucose et la cellulose, chez plusieurs espèces d'insectes (Shao *et al.* 2014; Alonso-Pernas *et al.* 2017). Parmi les *Enterobacteriaceae*, le genre *Lelliottia* se distingue par sa plus grande activité chez les mâles, tout en étant également enrichi chez les femelles. Il a été démontré que les bactéries de ce genre sont capables d'oxyder le fructose, composant principal des nectars végétaux (Brady *et al.* 2013).

La supplémentation en glucose ou tréhalose, les sucres principaux trouvés dans l'hémolymphe des moustiques, conduit à la prolifération d'une bactérie commensale d'*An. stephensi* : *Asaia bogorensis*. Cette dernière est capable de moduler le métabolisme du glucose

entraînant une augmentation du pH de l'intestin, ce qui a pour effet de promouvoir l'infection par *Plasmodium* en modifiant l'équilibre acido-basique intestinal (Wang *et al.* 2021).

Une étude s'est intéressée à la modulation du microbiote d'*Ae. aegypti* par des plantes médicinales provenant d'Inde (Gupta *et al.* 2021). Néanmoins, les auteurs ont isolé sur gélose les bactéries du microbiote des stades larvaires et ont simplement exposé ces colonies bactériennes aux extraits de plantes.

Il a été démontré que le moustique *Ae. aegypti* infecté par la bactérie pathogène pour l'humain, *Francisella tularensis*, peut déposer cette bactérie sur une fleur en s'y nourrissant. La bactérie, suffisamment résistante pour persister, survit dans le nectar. Lorsqu'un autre moustique vient à son tour se nourrir de ce nectar, il peut s'infecter à son tour. Cette étude met en lumière la possibilité d'une transmission de bactéries entre moustiques via la consommation de nectar (Kenney *et al.* 2017). De la même manière, les bactéries associées aux plantes appartenant au genre *Asaia* peuvent également être transmises à des individus moustiques naïfs au travers de repas de jus sucré (Bassene *et al.* 2020).

ii. Influence des repas sanguins sur le microbiote

Chez *An. coluzzii*, la prise d'un repas sanguin entraîne une augmentation significative du microbiote, qui n'est que transitoire : le microbiote revient rapidement à son état d'homéostasie initial grâce à la formation d'une membrane péritrophique, qui sépare physiquement le repas sanguin des cellules épithéliales de l'intestin (Rodgers *et al.* 2017b). Ce processus conduit à une clairance significative du microbiote (réduction de 98%) acquis lors du repas sanguin afin de revenir à l'état initial (Sarma *et al.* 2022). La présence de bactéries est essentielle pour la formation de cette barrière, qui limite la croissance et la persistance de certains taxons bactériens et empêche leur pénétration dans la circulation générale du moustique. Dans des souches de laboratoire d'*Ae. aegypti*, la prise d'un repas sanguin conduit à une augmentation des entérobactéries (connues pour leur activité hémolytique), qui participent à la digestion du repas sanguin avant un retour à la normale. Ce processus s'accompagne d'un changement de composition et de fonction du microbiote, permettant le catabolisme des acides aminés et des sucres (Salgado *et al.* 2024). La prise d'un repas de sang a donc un effet au moins transitoire sur le microbiote des moustiques adultes.

L'espèce sur laquelle le repas sanguin a été pris influence également le microbiote (Sarma *et al.* 2022). Chez *Ae. aegypti* capturés sur le terrain, un repas sanguin sur l'humain favorise les classes bactériennes *Rhodobacterales* (*Rhodobacteraceae*, qui augmente la susceptibilité d'*Ae.*

aegypti à l'infection par le virus Zika) et *Neisseriales*. En revanche, un repas sur un hôte non humain augmente la diversité des espèces observées dans le microbiote. Il est possible que les bactéries du microbiote cutané de l'hôte, également retrouvées dans le microbiote du moustique après le repas sanguin, jouent un rôle dans la sélection de l'hôte.

Il a été démontré que des variations qualitatives et quantitatives de la ressource alimentaire des moustiques adultes peuvent modifier la composition et l'abondance des communautés microbiennes (Duan *et al.* 2020; Kennedy *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020; Almire *et al.* 2021; Mizushima *et al.* 2023). Néanmoins, ces variations sont généralement basées sur des régimes alimentaires « artificiels » et non pertinents écologiquement parlant. Les auteurs font généralement varier les sources de sucres entre différents sucres de synthèse et chez *Ae. albopictus*, aucun article n'a tenté de modifier le microbiote et/ou la compétence vectorielle au travers de repas végétaux.

En conclusion, une partie du microbiote des moustiques adultes est acquise à partir de l'habitat aquatique des larves, tandis que l'autre fraction dépend des ressources alimentaires, soit par des sources naturelles de sucre d'origine végétale, soit par des repas de sang pour les femelles. La composition et la diversité bactériennes sont modifiées suite à un repas de sucre et/ou de sang, ce qui augmente les différences inter-individuelles. Cependant, finalement, assez peu voire aucune étude ne s'intéresse aux repas végétaux naturels des moustiques en général et à leurs effets sur le microbiote (Bassene *et al.* 2020).

b. Application aux gastéropodes d'eau douce

Chez les gastéropodes d'eau douce, assez peu d'éléments sont connus concernant leurs microbiotes. Quelques travaux s'étaient intéressés à la « flore » cultivable de *Biomphalaria glabrata* provenant de diverses localités et l'avaient comparé à celle de souches de laboratoire (Ducklow *et al.* 1979, 1981). Le microbiote était dominé par les familles *Aeromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* et *Pseudomonadaceae*. De plus, il y avait des différences dans les compositions entre souches ; et les mollusques de laboratoire présentaient des communautés plus complexes que ceux de terrain. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ceci devait être dû à la proximité entre mollusques en aquarium, conduisant à plus d'échanges. Une autre étude a comparé les microbiotes de *B. glabrata* brésiliens du terrain à la même souche mais élevée en laboratoire (Silva TM *et al.* 2013). A nouveau, cette étude était basée sur la mise en culture des bactéries et le microbiote était composé des familles *Rhodobacteraceae*, *Commamonadaceae* et de *Xanthomonadaceae*. A nouveau, les auteurs ont observé des différences entre les souches de laboratoire et les souches de terrain.

Les travaux plus récents utilisent des techniques indépendantes de la culture pour identifier la composition du microbiote. En effet, il a été démontré que la majorité des bactéries n'était pas cultivable avec les méthodes de culture traditionnelles en laboratoire. Environ 99% des bactéries environnementales ne peuvent pas être cultivées sur des milieux de culture standard. Cela est dû à plusieurs facteurs, notamment les conditions spécifiques de croissance nécessaires que nous ne connaissons pas encore ou ne pouvons pas reproduire en laboratoire (Austin B 2017). Ainsi, l'étude plus récente de Huot *et al* s'est attaché à comparer les microbiotes de diverses espèces de *Planorbidae* dont *Bulinus truncatus* (Huot *et al.* 2020). En comparant la structure des communautés de bactéries associées aux différentes espèces hôtes et l'arbre phylogénétique de ces espèces hôtes, les auteurs ont pu mettre en évidence un patron de phylosymbiose. Autrement dit, les auteurs ont pu superposer la phylogénie des mollusques avec la composition de leur microbiote bactérien. Ces résultats ont permis de suggérer que l'histoire évolutive des hôtes joue un rôle important dans la structuration des communautés microbiennes au sein de ces hôtes. Ensuite, les auteurs ont voulu voir la part jouée par l'environnement sur la structuration du microbiote. Pour ce faire, ils ont élevé les différentes espèces de mollusques en jardin commun pendant un mois. Malgré ces contacts étroits entre espèces, le microbiote ne s'est pas harmonisé et chaque souche a gardé sa composition microbienne ce qui suggère que l'hôte a un effet supérieur à l'environnement dans la composition et la structure du microbiote.

Dans une autre étude plus récente, McCann *et al.* ont montré que les microbiotes d'individus de *G. truncatula* issus de populations provenant de deux fermes éloignées géographiquement présentaient des compositions différentes (McCann *et al.* 2024). Le microbiote des individus était également différent du microbiome environnemental. Ce dernier était plus complexe que les communautés associées aux individus. Les auteurs trouvent également des différences dans le microbiote des individus parasités (peu importe l'espèce de trématode) *versus* sains en bêta-diversité.

Ainsi, quelques travaux ont permis de caractériser le microbiote de *G. truncatula* et *B. truncatus*. Néanmoins, aucun ne s'est intéressé à l'origine (environnementale ou génétique) de ces communautés, puisque l'article sur *G. truncatula* compare simplement le microbiote des hôtes au microbiome environnemental et celui sur *B. truncatus* évalue principalement l'effet de la génétique. De plus, aucun ne s'intéresse à l'influence de facteurs environnementaux ni au lien avec la compétence vectorielle de ces hôtes. Ce qui a fait l'objet de ces travaux de thèse.

V. Le séquençage haut-débit, une technique qui a révolutionné l'étude du microbiote et des communautés complexes

La caractérisation de la diversité des espèces est cruciale pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes. Traditionnellement, cette caractérisation reposait sur des critères morphologiques, mais ces derniers présentent des limites, notamment pour les micro-organismes et les trématodes. Dans ces cas, les techniques moléculaires, comme le métabarcoding, deviennent essentielles.

Depuis les années 2000, l'utilisation de fragments d'ADN pour identifier les espèces s'est largement répandue, offrant des avantages en termes de rapidité, de fiabilité et de précision. Le métabarcoding, ou « métagénomique sur amplicon ciblé », est une technique de séquençage haut-débit qui permet d'identifier de nombreuses espèces à partir d'un échantillon complexe en utilisant un marqueur spécifique.

Dans ces travaux de thèse, le métabarcoding a permis d'identifier toutes les espèces présentes dans un environnement, même lorsque les individus n'étaient pas distinguables ou séparables (Medini *et al.* 2008). Le processus commence par l'extraction de l'ADN d'un échantillon, suivie de l'amplification par PCR du fragment d'intérêt correspondant au 'code-barre' à l'aide d'amorces spécifiques. Ces amorces ciblent un large spectre d'espèces, et les amplicons obtenus sont ensuite séquencés. L'avènement de la technologie Illumina a réduit les coûts de séquençage tout en maintenant une profondeur de séquençage adéquate, généralisant ainsi l'utilisation de ces approches (Caporaso *et al.* 2012).

VI. Triade compétence vectorielle / Facteurs biotiques (microbiome) / Facteurs abiotiques

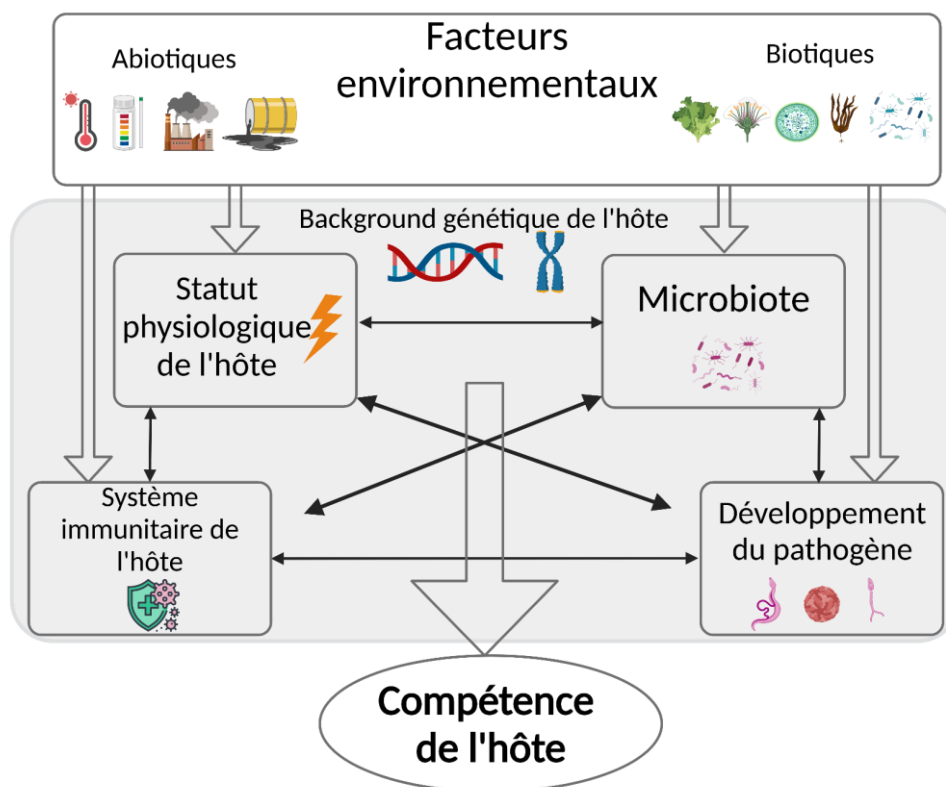


Figure 3 : Place du microbiote dans le triptyque formé par les vecteurs, les pathogènes et l'environnement.

Comme mentionné précédemment, les variations des ressources alimentaires, qu'elles soient dues à des écosystèmes contrastés ou à des changements saisonniers, peuvent avoir un impact significatif sur la composition et la diversité du microbiote au niveau individuel, puisqu'elles sont, au moins en partie, contrôlées par la qualité et la quantité des ressources alimentaires disponibles dans l'environnement. En outre, il est de plus en plus reconnu que le microbiote influence plusieurs aspects des interactions entre vecteurs et parasites (Guégan *et al.* 2018; Gao *et al.* 2019) (**Figure 3**).

Si le microbiote et le régime alimentaire d'un organisme jouent un rôle central dans le triptyque formé par l'hôte/vecteur, les pathogènes et l'environnement, des variations dans les facteurs environnementaux biotiques et abiotiques pourraient potentiellement influencer la compétence vectorielle des hôtes au travers du microbiote (**Figure 3**). Le microbiote se situe donc à l'intersection entre l'environnement (microbiome) et le statut physiologique de l'hôte ou du vecteur, incluant ses fonctions métaboliques et immunitaires.

VII. Modèles biologiques

Les recherches menées au cours de cette thèse se sont concentrées sur trois modèles biologiques : une espèce de moustique et deux espèces de gastéropodes. Les moustiques, capables de transmettre diverses espèces de virus, ont été représentés par *Ae. albopictus* dans ces travaux de thèse. Les gastéropodes aquatiques, qui servent d'hôtes intermédiaires à plusieurs pathogènes y compris des nématodes et des trématodes, ont été représentés par *Galba truncatula* (déjà présente en France) et *Bulinus truncatus* (présent aux portes de l'Europe). Ces trois espèces, autrefois vectrices de maladies infectieuses dans les régions tropicales, sont désormais établies localement dans le sud de l'Europe, mais avec différents degrés d'endémicité.

1) *Aedes albopictus*

Aedes albopictus, ou moustique tigre asiatique, est une espèce de moustiques originaire d'Asie du Sud et l'Est qui appartient à la famille des *Culicidae* (**Figure 4**). C'est un moustique facilement reconnaissable, noir à rayures blanches, avec une ligne blanche sur le thorax, qui mesure moins de 0,5cm.



Figure 4 : Photo d'une femelle d'*Aedes albopictus* (Nil Rahola/IRD).

Sa période d'activité est diurne et dure de début mai à fin novembre. Il apprécie le milieu urbain où il trouve de nombreux endroits où se développer (soucoupes de pots de fleurs, pneus

usagés, gouttières mal nettoyées, bidons et réservoirs d'eau...) mais peut également pondre en milieu naturel. C'est un moustique anthropophile (Medlock *et al.* 2012).

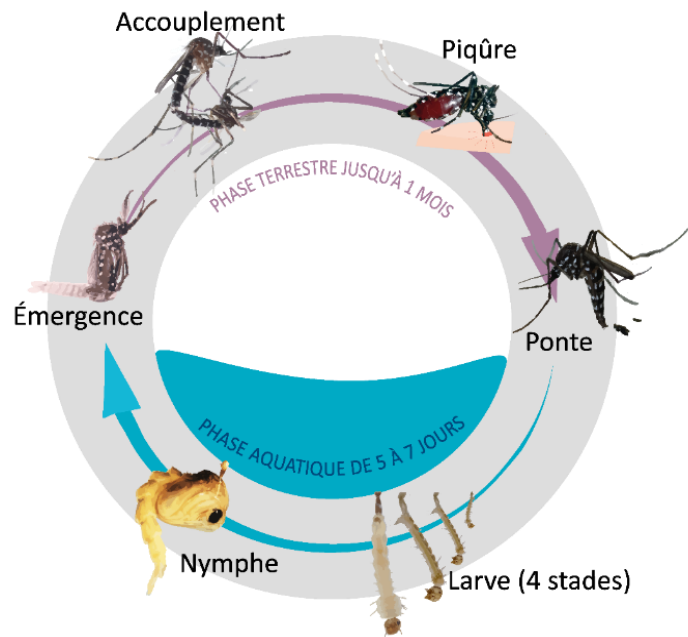


Figure 5 : Cycle de vie de *Aedes albopictus* (EID Méditerranée)

Le cycle de vie d'*Ae. albopictus* (**Figure 5**) comprend une phase aquatique (œufs, larves, nymphes) et une phase aérienne (adultes). Il débute par un repas sanguin d'une femelle sur un hôte vertébré. Après la reproduction et environ trois jours d'ovogenèse, la femelle pond ses œufs dans l'eau. Si les conditions d'humidité et de température sont favorables, les œufs éclosent et libèrent des larves qui respirent grâce à un siphon et se nourrissent de débris organiques présents dans l'eau mais peuvent également être opportunistes et prédater le microzooplancton et d'autres petits organismes aquatiques. Ces larves passent par quatre stades larvaires, dont la durée varie de moins de 10 jours en été à plusieurs mois en hiver, selon la température et la disponibilité en nourriture. Le dernier stade larvaire se transforme en nymphe, qui reste aquatique et ne se nourrit pas. Le stade nymphal dure de 2 à 3 jours, après quoi la nymphe s'immobilise à la surface de l'eau, sa face dorsale se déchire, et l'adulte émerge pour s'envoler, passant ainsi de la phase aquatique à la phase aérienne.

Les mâles et femelles *Ae. albopictus* sont phytophages et consomment divers liquides végétaux sucrés comme la sève des arbres, le nectar des fleurs et les exsudats des fruits (Barredo and DeGennaro 2020; Fikrig *et al.* 2020; Foster 2022; Upshur *et al.* 2023). Ces sources de sucre naturel leur fournissent l'énergie métabolique nécessaire pour voler. Cependant, pour assurer leur reproduction, les femelles sont également hématophages. Les repas de sang leur apportent l'énergie essentielle pour stimuler la croissance des ovaires et la ponte des œufs. En se nourrissant

de sang sur un hôte virémique, elles peuvent acquérir un pathogène et le transmettre à un autre hôte lors d'un repas sanguin ultérieur par leur salive.

En raison de la globalisation des échanges, *Ae. albopictus* a étendu son aire de répartition vers le nord. Originaire d'Asie du Sud-Est, il a d'abord atteint l'Amérique, puis l'Europe, principalement par le transport passif de ses œufs résistants à la dessiccation via le commerce intercontinental de pneus (Paupy *et al.* 2009). Une fois en Europe, il s'est principalement propagé d'abord dans le sud (Caminade *et al.* 2012) puis de plus en plus vers le Nord de l'Europe (Oliveira *et al.* 2023; Wilkman *et al.* 2023; Laverdeur *et al.* 2024) principalement par son transport accidentel en voiture (**Figure 6**). Il est considéré comme l'une des espèces les plus invasives au monde d'après le groupe 'Invasive Species Specialist Group' (2009).

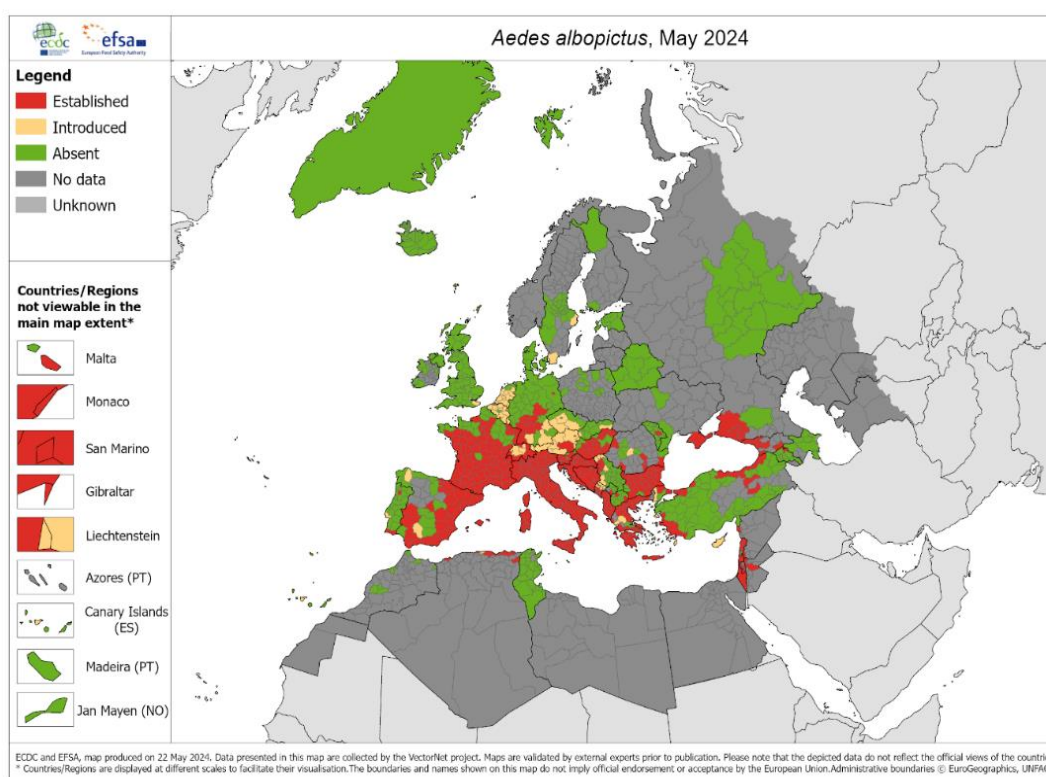


Figure 6 : Carte de répartition d'*Aedes albopictus* en Europe (European Centre for Diseases Prevention and Control, ECDC)

Cette espèce de moustique est vectrice de nombreuses maladies infectieuses (au moins 22 espèces d'arbovirus) (Yamany and Abdel-Gaber 2024), dont le chikungunya (Pialoux *et al.* 2007; Grandadam *et al.* 2011) et la dengue (Ruche *et al.* 2010; Gould *et al.* 2010). Le moustique s'infecte en prenant un repas sanguin sur un hôte infesté en phase virémique. Après l'ingestion, le virus migre et se réplique dans les cellules de l'intestin postérieur du moustique puis passe dans la

circulation générale pour arriver dans les ovaires. Au terme de sa période extrinsèque d'incubation (de l'ordre de 10 à 12 jours), le virus envahit le système nerveux et les glandes salivaires du moustique. Il restera dans l'insecte durant toute sa vie (Coffey *et al.* 2014; Mukherjee *et al.* 2019) (**Figure 7**).

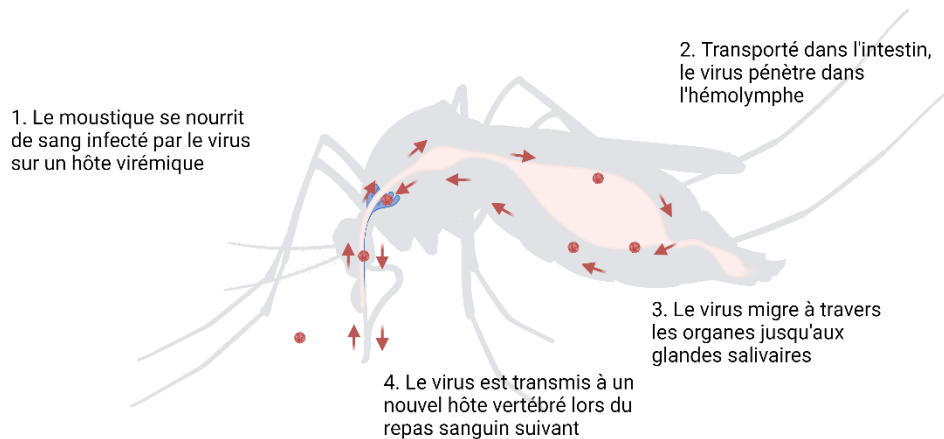


Figure 7 : Cycle des arbovirus au sein de leur vecteur moustique (adapté de la figure de © Adrian LEUNG, John SAEKI, AFP)

Aujourd'hui, le virus de la dengue (**Box 1**) représente un problème de santé publique à l'échelle mondiale (**Figure 8**). En effet, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les cas déclarés ont été multipliés par dix entre 2000 et 2019, passant de 0,5 million à 5,2 millions de cas. Depuis 2023, la transmission soutenue de la dengue, associée à une recrudescence inattendue des cas, a entraîné plus de 5 millions d'infections signalées dans plus de 80 pays/territoires, dont plus de 5 000 décès liés à la dengue. La dengue constitue donc une menace importante pour la santé de milliards d'individus et représente un fardeau considérable à l'échelle mondiale (Ni *et al.* 2024). Concernant l'Europe, un total de 66 cas autochtones a été enregistré en 2022 dont 65 cas en France (Santé Publique France 2022) et 1 en Espagne (Fundación iO 2022). En 2023, 130 cas au total ont été signalés en Europe, dont 82 en Italie (Istituto Superiore di Sanità), 45 en France (Santé Publique France 2024) et 3 en Espagne (Herrero-Martínez *et al.* 2023). Enfin, si on regarde la situation en France, du 1er janvier au 19 avril 2024, 1 679 cas de dengue importés ont été signalés en France (13 fois plus qu'en 2023 sur la même période) par l'agence sanitaire Santé Publique France, avec plus de 82% des cas revenant des Antilles françaises où une épidémie sévit depuis mi-2023 (Bohers *et al.* 2024).

Dans le cas du virus chikungunya (**Box 1**), avant 2006, les variants originels étaient responsables de cas sporadiques en Afrique et Asie du Sud Est, avec quelques petites épidémies limitées en nombre de cas (Yergolkar *et al.* 2006). Puis, en 2006, un nouveau variant a émergé et a causé une épidémie comptant 775 000 cas sur l'Île de la Réunion (Bonn 2006; Josseran *et al.* 2006). Ce variant est né d'une mutation de la souche virale ECSA (East/Central/South African), transformant une alanine en valine en position 226 de la protéine d'enveloppe E1. Cette mutation permet une réplication accrue et donc une transmission efficace par *Ae. albopictus* en plus d'*Ae. aegypti* (Tsetsarkin *et al.* 2007). Avec la globalisation des échanges, le virus est arrivé en Europe et, en 2007, a été responsable d'épidémies en Italie (205 cas) (Rezza *et al.* 2007), puis en 2010, en France, dans le département du Var (2 cas) (Gould *et al.* 2010; Grandadam *et al.* 2011). En 2014, le variant asiatique est arrivé dans les Départements d'Outre-Mer (Leparc-Goffart *et al.* 2014) puis a fini par se propager, en 2015, sur le continent Américain où il est responsable de 37 480 cas confirmés (Bureau régional de l'Organisation Panaméricaine de la Santé). Ensuite, il en a causé 146 914 en 2016. Depuis l'arrivée du virus en Europe, plusieurs résurgences d'épidémies ont eu lieu à l'échelle locale (Tjaden *et al.* 2021). En effet, en 2014, il y a eu 12 cas autochtones de chikungunya à Montpellier (Delisle *et al.* 2015) et en 2017, 270 cas confirmés en Italie (ECDC 2017; Venturi *et al.* 2017; Rezza 2018). En outre, en raison de températures hivernales de plus en plus clémentes dans les zones tempérées, la période d'activité des moustiques s'allonge, conduisant à des périodes de circulation potentiellement plus longues (Collantes *et al.* 2014; Šebesta and Gelbič 2016; Del Lesto *et al.* 2022). La maladie provoquée par le virus du chikungunya, plutôt qu'une maladie aiguë non mortelle, est désormais prouvée comme pouvant évoluer, présenter des tableaux cliniques atypiques et avoir des conséquences à long terme avec des formes chroniques invalidantes (de Andrade *et al.* 2010). Or, aujourd'hui, le virus est encore responsable d'épidémies (**Figure 8**) pour lesquelles il n'existe ni traitement spécifique ni vaccin (de Lima Cavalcanti *et al.* 2022).

Box 1 : Biologie des virus de la dengue et du chikungunya

DENV : flavivirus, virus de la famille des Flaviviridae, transmis principalement par les espèces de moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Il existe 4 sérotypes de DENV et l'infection par un sérotype ne confère pas d'immunité contre les autres. Après une piqûre de moustique infecté, le virus se multiplie dans les cellules de l'hôte, puis se dissémine dans tout le corps. Les symptômes incluent généralement de la fièvre, des maux de tête sévères, des douleurs articulaires et musculaires, des éruptions cutanées, et parfois des saignements. Dans certains cas, cela peut évoluer vers une forme plus sévère appelée dengue hémorragique, qui peut être mortelle sans traitement approprié.

CHIKV : alphavirus, virus de la famille des Togaviridae, principalement transmis par les espèces de moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Après une piqûre par un moustique infecté, le virus se multiplie dans le corps de l'hôte, provoquant des symptômes aigus tels que de fortes fièvres, des douleurs articulaires sévères (souvent incapacitantes), des éruptions cutanées et des maux de tête. Cycle sylvatique à l'origine avec primates non humains.

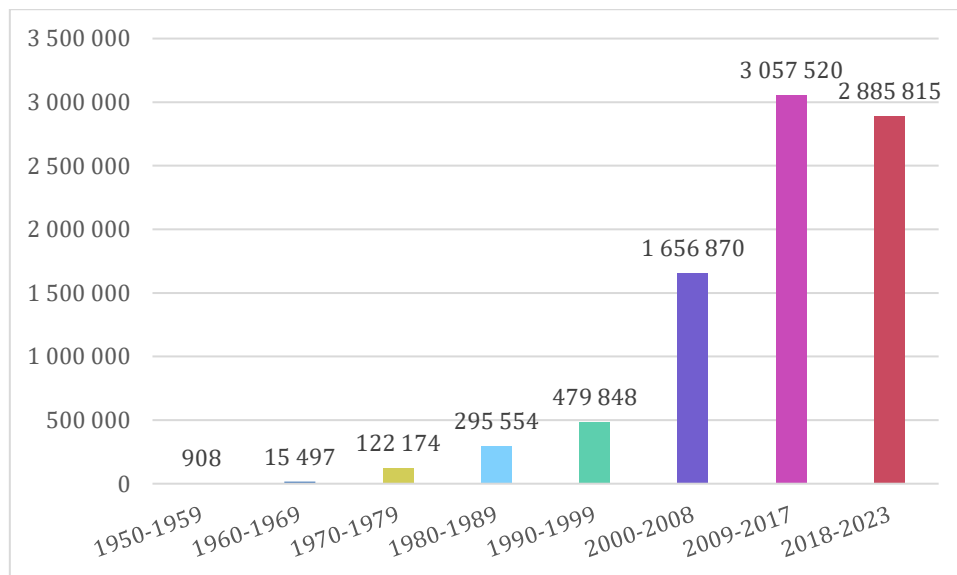


Figure 8 : Evolution du nombre de cas mondiaux de dengue entre 1950 et 2023 (adapté de (Siriya-satien *et al.* 2018; Clarke *et al.* 2024)).

Pour le modèle moustique, les liens entre microbiote et compétence vectorielle sont bien établis, notamment chez *Ae. aegypti*, et *Anopheles spp.* Pour *Ae. albopictus*, c'est moins le cas. Or, une fois que le virus se trouve dans l'intestin et qu'il doit pénétrer dans l'hémolymph pour se disséminer, il doit traverser les cellules épithéliales et peut alors se retrouver en contact avec le microbiote de son hôte (Minard *et al.* 2018). Ce microbiote peut avoir un impact direct sur la réplication virale par la production de facteurs antiviraux ou par un effet de barrière. Il peut également induire des effets indirects, tels que le priming immunitaire.

Il subsiste des zones d'ombres sur l'influence que la diète végétale peut avoir sur la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus*. Dans cette thèse, j'ai donc exploré cet aspect encore peu étudié de la biologie des moustiques : leurs relations avec les plantes. Comme mentionné précédemment, les moustiques mâles et femelles pratiquent la phytophagie, ce qui peut influencer leur compétence et capacité vectorielle. Ce phénomène a été démontré à plusieurs reprises en laboratoire, notamment dans le modèle *Anopheles/Plasmodium*. Par exemple, Gu *et al.* (2011) et Ebrahimi *et al.* (2018) ont évalué les liens entre phytophagie et capacité vectorielle, tandis qu'Hien *et al.* (2016) ont évalué les effets de la phytophagie à la fois sur la capacité et la compétence vectorielle. Cependant, à l'exception de ces trois études, la plupart des autres recherches utilisent des approches différentes qui, bien que très utiles, n'incluent pas des plantes naturelles. De nombreuses recherches conduites en laboratoire nourrissent les moustiques adultes avec divers types de sucres non issus de plantes pour observer les effets sur le microbiote (David *et al.* 2016; Nunes *et al.* 2016; Salgado *et al.* 2024), sur la compétence ou la capacité vectorielle (Gary and Foster 2001; Almire *et al.* 2021; Tenywa *et al.* 2024), voire sur les deux à la fois (Wang *et al.* 2020; Mizushima *et al.* 2023). Ces approches présentent l'avantage de pouvoir contrôler et standardiser le type et la quantité de sucre donné aux moustiques, permettant ainsi d'obtenir des expériences répétables, bien qu'elles ne reflètent pas toujours la variabilité naturelle des sucres issus des plantes au cours du temps et dans l'espace. Dans la majorité de ces publications, aucune hypothèse n'est émise quant au mécanisme par lequel la diète influence la compétence vectorielle des hôtes. L'une des rares publications qui émet des hypothèses est celle d'Almire *et al.* 2021 qui nourrit des *Ae. aegypti* avec différentes concentrations de sucrose ou sur du fructose et observe les effets sur la compétence vectorielle pour les virus de la forêt de Semliki et Zika. Les auteurs observent des différences entre les sucres et les concentrations sur les taux d'infection et de dissémination, montrant que les repas de sucre peuvent augmenter l'immunité antivirale du vecteur. Ils explorent ces effets en présence d'un microbiote sain ou perturbé par des antibiotiques, ce qui leur permet de conclure que l'effet du sucre sur la compétence vectorielle n'est pas médié par le microbiote. Par conséquent, à ce jour, les mécanismes par lesquels les repas naturels de plantes influencent la compétence vectorielle n'ont pas encore été explorés.

2) *Galba truncatula*

Galba truncatula, également connue sous le nom de limnée tronquée, est un mollusque d'eau douce appartenant à la famille des *Lymneidae* (**Figure 9**). En termes d'habitat, la limnée tronquée préfère les zones humides et temporaires, avec des eaux stagnantes et peu profondes avec une végétation abondante mais est capable de coloniser des milieux avec des régimes hydrographiques très variables (rivières, canaux d'irrigation, barrages) (Vareille-Morel *et al.* 1999). Elle tolère également bien les eaux polluées (Manea and Alexandrescu 2013).

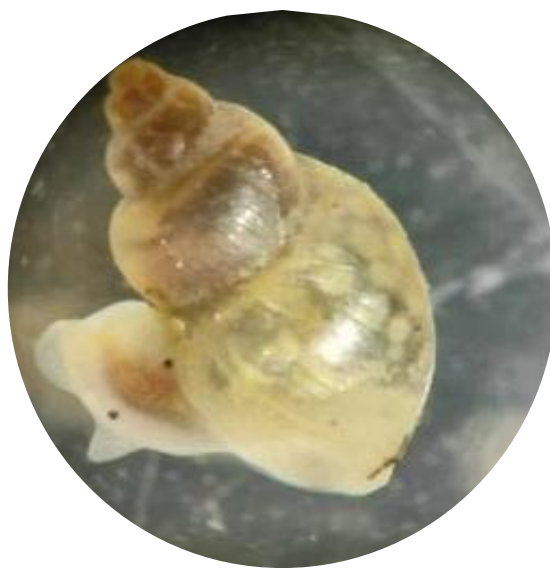


Figure 9 : Photographie de *G. truncatula*.

Galba truncatula est hermaphrodite et pratique principalement l'autofécondation, bien qu'elle soit également capable d'allofécondation (Trouve *et al.* 2005). Ce mollusque est largement répandu et bien établi en Europe, notamment en France (**Figure 10**), mais aussi dans d'autres régions du monde (**Figure 11**) bien que la détermination précise de ses différentes localisations soit complexe. En effet, les limnées ont tendance à s'enfoncer dans les sédiments, rendant sa détection complexe et chronophage. Par conséquent, de nombreuses études se contentent d'identifier des 'gîtes' favorables aux limnées en se basant sur la présence de plantes propices à leur établissement (Rondelaud *et al.* 2011). Cependant, cette méthode est moins précise que la prospection directe des individus, car elle ne permet que de déterminer des zones potentiellement favorables.

parasitaire du foie qui appartient à la liste des maladies tropicales négligées (MTN), établie par l'OMS. Contrairement à la plupart des autres trématodes qui ont une spécificité étroite vis-à-vis de leurs hôtes intermédiaires, *F. hepatica* infecte une large diversité d'hôtes intermédiaires.

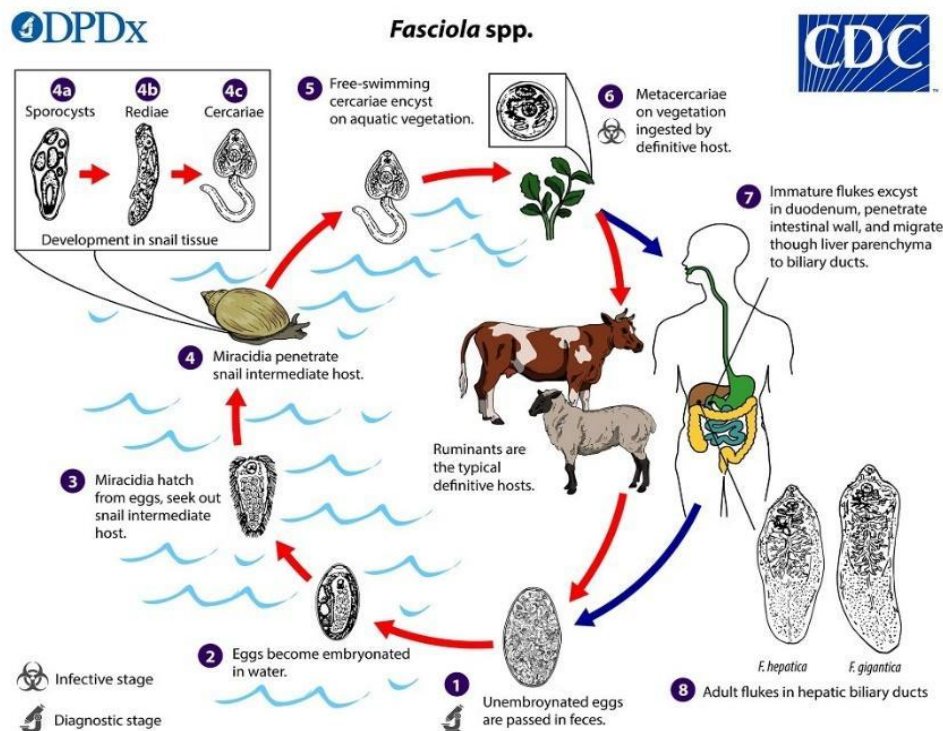


Figure 12 : Cycle de vie de *Fasciola hepatica* (Center for Disease Control and Prevention).

Le cycle de vie de *F. hepatica* est hétéroxène impliquant un hôte intermédiaire et un hôte définitif. Environ 40 espèces de mammifères à la fois domestiques et sauvages ont été identifiées comme pouvant servir d'hôte définitif à *Fasciola hepatica* parmi lesquelles ovins, bovins, chevaux, chameaux, ragondins, lapins, humains... (Alba *et al.* 2021) (**Figure 12**). Les vers adultes résident dans les canaux biliaires hépatiques, où ils se reproduisent sexuellement. Chaque couple de parasites produit environ 40 000 œufs par jour, qui sont ensuite excrétés dans les fèces. Lorsque les conditions de température et d'humidité sont favorables, les œufs peuvent s'enkyster et libérer une larve nageuse ciliée, le miracidium, en 2 à 3 semaines (Moazeni and Ahmadi 2016). Cette larve dispose de 24 heures pour trouver et infester un mollusque hôte intermédiaire du genre *Galba*. L'attraction vers l'hôte se fait généralement par phototropisme positif, suivi de chimiotactisme (Chipev 1993). Une fois à l'intérieur du mollusque, la larve se développe successivement en trois stades de différenciation liés à la reproduction asexuée du parasite : le sporocyste, la rédie puis la cercaire. Chaque rédie produit une dizaine de cercaires (Rondelaud *et al.* 2013). Les cercaires sont émises de jour comme de nuit, et s'enkystent sur la végétation

aquatique (Dreyfuss *et al.* 2004), se transformant en métacercaires, forme infestante pour l'hôte définitif. L'infestation de l'hôte définitif se fait par l'ingestion de métacercaires présentes dans l'eau ou fixées sur la végétation (Hurtrez-Boussès *et al.* 2001). Dans le duodénum de l'hôte, la cercaire enkystée libère une douve juvénile qui migre vers les canaux biliaires hépatiques, où les vers adultes s'établissent et atteignent leur maturité.

L'OMS estime que 2,4 millions de personnes sont touchées par la fasciolose dans plus de 75 pays. Ils considèrent également que de nombreuses personnes sont à risque de développer la maladie. Comme pour les autres maladies négligées, les fascioloses sont généralement non mortelles (au moins à court terme), cliniquement bénignes et non déclarées, mais ce sont des maladies invalidantes qui maintiennent ou augmentent la pauvreté. La fasciolose représente un problème de santé publique mondial puisqu'elle constitue un risque pour la santé humaine, en particulier, dans les régions les plus pauvres où les habitants vivent en contact étroit avec le bétail. Cette maladie est également un problème de santé vétérinaire puisqu'elle affecte les ruminants du monde entier et conduit à une diminution de la production de lait et de viande (Regasa and Seboka 2022). Ces diminutions de productions associées aux coûts liés au traitement du bétail causent des pertes économiques significatives pour les éleveurs dans l'industrie agricole.

Dans les années 1990, le nombre de cas humains de fasciolose était estimé à 2954. Aujourd'hui, il est estimé à 2,6 à 17 millions de cas (Infantes *et al.* 2023). Cette augmentation drastique du nombre de cas est attribuée à l'amélioration des techniques de diagnostic mais également à l'expansion de *F. hepatica* et de ses hôtes intermédiaires. *F. hepatica* est présente dans 81 pays et sévit principalement en Amérique du Sud et en Afrique. Le parasite est présent sur les rives Nord et Sud du bassin méditerranéen. Dans certains pays de la rive Sud comme l'Égypte (Soliman 2008), elle est responsable de cas humains, tandis que sur la rive Nord, elle touche principalement le bétail (Roldán *et al.* 2021) avec de grandes disparités en fonction des zones (Beesley *et al.* 2018). Ainsi, la fasciolose est passée de maladie peu fréquente dans les années 1990 (Teichmann *et al.* 2000) à une maladie plus répandue aujourd'hui. Avec l'augmentation des températures, la saison de transmission risque de se décaler et de s'allonger, avec une diminution du risque lors des étés trop secs mais une augmentation pendant l'automne et le printemps. De plus, on observe des résistances du parasite au Triclabendazole, traitement anthelminthique de référence (Kelley *et al.* 2016), même si l'obtention de chiffres officiels est compliquée dans la mesure où il n'existe pas de test facilement réalisable sur le terrain (Beesley *et al.* 2018). Selon les modélisations, les zones les plus susceptibles de voir leur prévalence de fasciolose augmenter sont le Nord de l'Espagne et du Portugal et l'Ouest de la France (Caminade *et al.* 2015). Les écosystèmes aquatiques de la zone méditerranéenne sont particulièrement vulnérables aux perturbations liées aux changements globaux. Véritable hotspot de biodiversité, plusieurs espèces présentes

constituent des réservoirs de zoonoses, fasciolose comprise et représentent donc une zone à fort risque d'émergence ou de réémergence.

Chez *G. truncatula*, il n'existe aucuns travaux qui évaluerait la modulation du microbiote par l'environnement ; ni l'effet du microbiote sur la compétence des mollusques. Seul l'article de (McCann *et al.* 2024) étudie les différences dans le microbiote d'individus provenant de deux fermes différentes situées dans deux comtés différents, en Irlande du Nord. Les paramètres environnementaux abiotiques n'ont pas été relevés. Seules les communautés bactériennes environnementales du sédiment ont été comparées aux communautés bactériennes des individus. Les microbiotes d'individus parasites et non parasités ont été comparés.

Chez *Lymnaea stagnalis*, une espèce proche de *G. truncatula*, il a été démontré que la pollution environnementale pourrait avoir un effet sur le microbiote (Horton *et al.* 2020). Cependant, les microplastiques modifient le microbiote qu'à la concentration la plus élevée et qu'en comparaison du contrôle sans microplastiques. Ainsi, une exposition aux concentrations présentes dans l'environnement ne devrait pas avoir d'effet sur le microbiote ou les traits d'histoire de vie des individus. Toujours chez ce modèle, il a été montré que l'exposition à des concentrations écologiquement pertinentes d'antibiotiques a un impact dose-dépendant sur le microbiote des hôtes mais également, que la mémoire des individus était diminuée (Davidson *et al.* 2024). Face à des stress environnementaux, *L. stagnalis* est capable de s'adapter via la plasticité de sa mémoire (Dalesman and Lukowiak 2010, 2012; Lukowiak *et al.* 2010), un comportement exploratoire (Dalesman and Lukowiak 2010; Liddon and Dalesman 2015) et la modulation de son métabolisme (Orr *et al.* 2007; Dalesman and Lukowiak 2010). Ici, les auteurs ont montré que les antibiotiques étaient capables de modifier ces traits et leur covariation en modifiant le microbiote des hôtes.

3) *Bulinus truncatus*

Le dernier modèle étudié dans ces travaux de thèse est *Bulinus truncatus*, un mollusque d'eau douce appartenant à la famille des *Planorbidae* (**Figure 13**). On le trouve principalement dans les eaux douces stagnantes ou à faible courant dans les mares, les rivières, ou les canaux d'irrigation.



Figure 13 : Photographie de *Bulinus truncatus* (Infection Landscapes®).

Bulinus truncatus est hermaphrodite et peut avoir recours à l'autofécondation et à l'allofécondation. Il préférera l'autofécondation en cas d'isolement et l'allofécondation en cas de risque d'infection parasitaire élevé afin d'augmenter la diversité génétique et de potentiellement améliorer la résistance aux maladies et parasites (Johnson *et al.* 1997). Ces deux types de reproductions ainsi que sa capacité à s'enfoncer dans la boue et les sédiments quand les conditions environnementales ne sont pas favorables en font un colonisateur efficace (Appleton 1978). Ainsi, *B. truncatus* est particulièrement bien établi en Afrique, y compris Madagascar ainsi qu'au Moyen-Orient (Brown 2014; Abe *et al.* 2018). Néanmoins, il est également implanté en Espagne, Italie, Grèce, au Portugal et dans la plupart des îles méditerranéennes dont la Corse (Simon *et al.* 1974; Mouahid and Mone 1990; Martínez-Ortí, A. *et al.* 2015).

Comme *G. truncatula*, *B. truncatus* présente un intérêt en malacologie médicale car il sert d'hôte intermédiaire aux trématodes *Schistosoma haematobium*, un parasite principalement humain et *S. bovis* un parasite principalement associé aux bovins. La bilharziose, la maladie induite par ces parasites, est également une maladie tropicale négligée qui touche environ 230-270 millions de personnes dont 120 millions seraient symptomatiques et 20 millions seraient des formes sévères. En outre, selon l'OMS, plus de 700 millions de personnes vivent en zone d'endémie et sont donc exposées au risque de bilharziose (Chitsulo *et al.* 2000). En 2000, la maladie était endémique dans 74 pays et territoires.

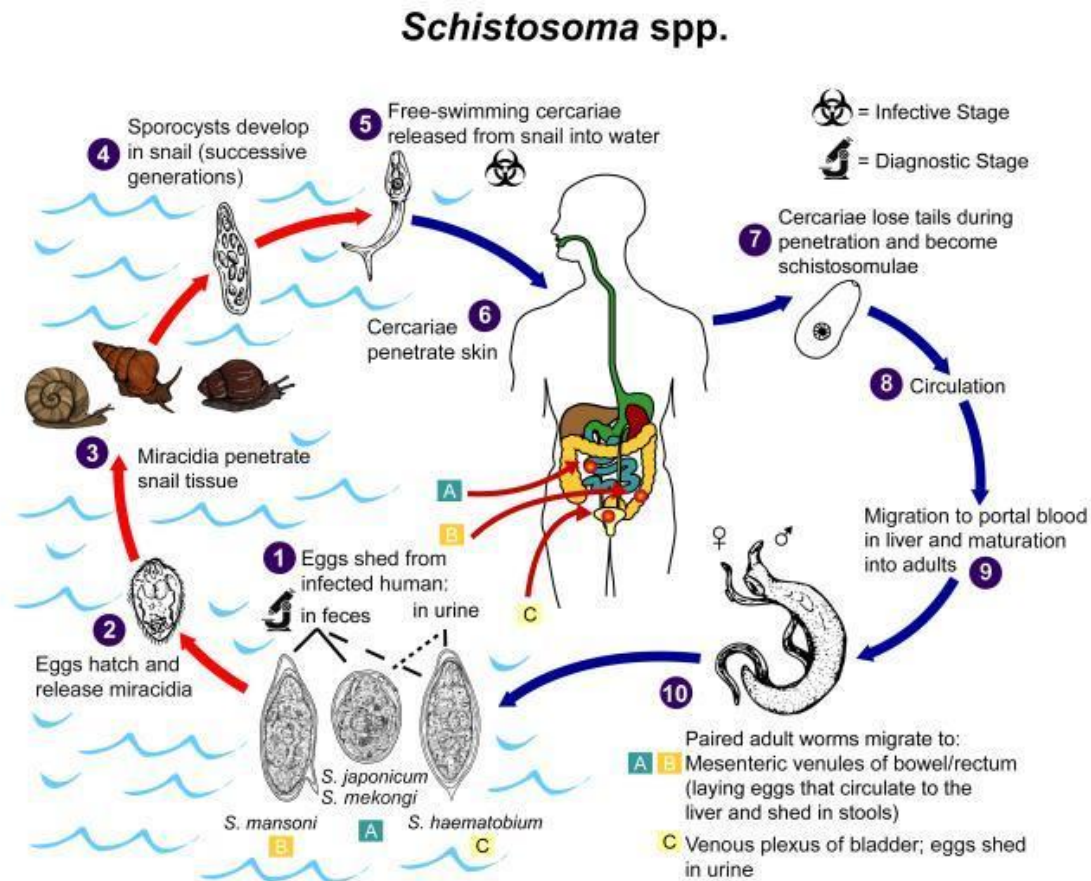


Figure 14 : Cycle de vie de *Schistosoma haematobium* (Center for Diseases Control and Prevention)

Le cycle de vie de *S. haematobium* est hétéroxène impliquant un hôte intermédiaire appartenant au genre *Bulinus* et un hôte définitif humain (**Figure 14**).

Dans l'hôte définitif, les œufs des vers adultes sont éliminés dans les urines. En cas de conditions appropriées (eau douce, pH neutre, température entre 18°C et 33°C), ils éclosent et libèrent une forme larvaire ciliée, le miracidium. Le miracidium nage à la recherche du mollusque hôte intermédiaire. Une fois le mollusque trouvé, la larve y pénètre et rejoint l'hépatopancréas, où elle produit deux générations de sporocystes qui se différencient en furcocercaires infestantes. Cette évolution larvaire prend environ un mois. Les furcocercaires, capables de nager grâce à leur queue bifide, quittent le mollusque et se retrouvent dans l'eau douce. Elles peuvent y survivre environ 48 heures, bien que leur infectivité décline rapidement après environ 4 heures. Lors d'un bain en eau contaminée, les furcocercaires sont attirées par l'humain par chimiotactisme. Elles pénètrent la peau, perdent leur queue fourchue et se transforment en schistosomules. Ces

dernières migrent à travers la circulation lymphatique puis sanguine vers les poumons, le cœur et enfin le foie. Une fois matures, elles quittent le foie par la veine porte. Après environ deux mois, les vers adultes mâles et femelles s'accouplent et remontent la circulation porte à contre-courant pour résider dans les plexus veineux vésicaux et pelviens de la vessie, mais peuvent également être retrouvés dans les veinules rectales. Une fois séparée du mâle, la femelle pond ses œufs dans les veinules. Ces œufs, munis d'un éperon, pénètrent soit dans la vessie, le tractus génital ou l'uretère, et sont éliminés dans les urines. Les vers adultes peuvent vivre de 3 à 5 ans, voire jusqu'à 30 ans dans certains cas particuliers. Ils sont extrêmement bien adaptés à leur environnement grâce à leur tégument, qui les protège du système immunitaire de l'hôte. Ce tégument les masque et lutte contre les mécanismes immunitaires, permettant aux vers adultes de se nourrir du sang de l'hôte tout en étant relativement bien protégés.

Ainsi, la contamination de l'hôte définitif passe par un bain en eau douce contaminée, contenant des furcocercaires.

Dans les années 1950, la bilharziose était principalement présente dans des pays tropicaux et subtropicaux et responsable de nombreux cas. Certaines zones ont réussi à éradiquer la maladie (exemple du Japon) mais d'autres ont vu les prévalences flamber d'une part à cause de l'augmentation de la population mais également à cause de la mise en place d'infrastructures agricoles. Aujourd'hui, la bilharziose représente la seconde maladie parasitaire la plus prévalente, après le paludisme. En effet, la maladie est présente dans 76 pays. *S. haematobium* a déjà émergé et a été responsable d'épidémies en Europe, notamment en Corse (Noël *et al.* 2018; Rothe *et al.* 2021). De plus, des populations de *B. truncatus*, son hôte intermédiaire, sont implantées en Espagne, au Portugal, en Italie, en Corse et dans d'autres îles méditerranéennes (Simon *et al.* 1974; Mouahid and Mone 1990; Martínez-Ortí, A. *et al.* 2015; Noël *et al.* 2018). De la même manière, des modélisations montrent que le changement climatique, en particulier l'augmentation des températures et les modifications des régimes de précipitations, pourrait favoriser la propagation de la schistosomiase urinaire en créant des conditions plus propices à la survie et à la reproduction des escargots hôtes intermédiaires (van der Deure *et al.* 2024). Ainsi, de nouvelles zones pourraient devenir propices à l'installation de populations de *B. truncatus* et conduire à une expansion géographique des zones à risque.

Chez *B. truncatus* et chez les autres mollusques hôtes intermédiaires de manière générale, peu de travaux ont été menés sur le lien entre facteurs environnementaux, microbiote et compétence vectorielle. Dans le cas de la bilharziose, les travaux les plus avancés ont été menés sur *Biomphalaria glabrata*. Les populations de ce dernier varient en termes de sensibilité à *S. mansoni*, témoin d'un polymorphisme de compatibilité qui dépend de multiples facteurs dont la génétique et probablement le microbiote (Clec'h *et al.* 2022). Ainsi, plusieurs études ont

caractérisé le microbiote de différentes populations de *B. glabrata* et Portet et al ont même testé ce microbiote au cours d'une cinétique de primo- et deuxième infestation par *S. mansoni* par des souches sympatrique ou allopatriques (Portet *et al.* 2021). Les résultats montrent que, rapidement après l'infection, *B. glabrata* subit une dysbiose due à la présence des parasites, sans effet de la souche infestante. Mais, de manière intéressante, les auteurs observent une « résilience » du microbiote bactérien, 25 jours après la primo-infestation, qui retourne à un état proche de celui à l'état naïf.

Chez *B. glabrata* toujours, plusieurs équipes ont tenté de créer des mollusques axéniques, c'est-à-dire sans microbiote. Dans l'étude de Chernin et al, il a été montré que les individus axéniques étaient aussi sensibles à l'infection par les schistosomes que les escargots non axéniques (Chernin 1960). Néanmoins, les individus axéniques survivaient plus longtemps que les non axéniques suite à l'infection. Ces résultats suggèrent que le microbiote n'est peut-être pas crucial pour prévenir l'infection par *Schistosoma* mais peut être important pour maintenir une bonne fitness malgré l'infection. Schols et al ont tenté de créer des mollusques axéniques en javellisant les œufs puis de leur transplanter le microbiote d'autres espèces de mollusques (Schols *et al.* 2023). Les transplantations fonctionnent bien et les mollusques receveurs, bien qu'ils n'aient pas un microbiote complètement superposable au microbiote des donneurs, en ont un proche. Néanmoins, les auteurs ne sont pas allés jusqu'à l'étape d'infection de ces mollusques transplantés. Ceci permettrait de voir comment microbiote et susceptibilité à l'infection par *S. mansoni* sont liés.

Ainsi, pour les modèles mollusques, de nombreux éléments restent encore à investiguer. Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés au microbiote de *B. truncatus* provenant de sites écologiquement contrastés au Sénégal. Nous nous sommes penchés sur l'origine (environnementale *versus* génétique) du microbiote de ces hôtes et au potentiel lien avec la compétence vectorielle. Pour *G. truncatula*, nous avons effectué le suivi temporel d'un site localisé en Camargue. Nous y avons relevé les paramètres environnementaux biotiques et abiotiques et avons relié ces paramètres au microbiote de nos hôtes. Nous avons également caractérisé la génétique des hôtes afin d'établir l'origine du microbiote. Enfin, nous avons regardé s'il existait un lien entre microbiote, infection par des microsporidies et compétence vectorielle de ces populations naturelles de *G. truncatula*.

Par conséquent, nous sommes face à trois modèles localement établis dans le Sud de L'Europe mais avec différents degrés d'endémicité. *G. truncatula* est endémique dans la région et la fasciolose est en réémergence. *Ae. albopictus* est également largement implanté, bien que depuis

moins longtemps dans les régions nordiques, et les arbovirus dont il est vecteur sont en pleine émergence dans la zone. *Bulinus truncatus*, n'est pour l'instant que très peu implanté en Europe du Sud sur les îles méditerranéennes, en Italie et en Espagne, et il en va de même pour la bilharziose à *S. haematobium*. Cependant, du fait des changements climatiques, des échanges commerciaux, et des migrations des populations humaines, ces parasites pourraient également circuler prochainement à des latitudes plus élevées (van der Deure *et al.* 2024).

VIII. Problématique, objectifs et plan de la thèse

Compte tenu du manque de connaissances sur les mécanismes qui sous-tendent les émergences et réémergences de maladies à transmission vectorielle, l'objectif principal proposé pour ma thèse est de décrypter les liens entre environnement, communautés microbiennes environnementales, microbiote des hôtes, régime alimentaire/diète, et compétence vectorielle des vecteurs et hôtes intermédiaires de maladies transmises par l'eau. Cet objectif se divise en deux axes principaux, chacun focalisé sur un des modèles. En effet, l'état des connaissances diffère entre les modèles moustiques et gastéropodes aquatiques, ce qui implique des points de départ différents.

Le premier axe s'est focalisé sur les gastéropodes aquatiques. Il a permis de combler des lacunes de connaissances sur la dynamique spatiale et temporelle de leur microbiote ainsi que des facteurs structurants dans des environnements naturels contrastés. Les buts de cet axe sont de (i) évaluer la diversité du microbiote des hôtes d'une part sous forme d'un suivi spatial et d'autre part dans un suivi temporel ; (ii) évaluer la diversité de la compétence vectorielle des hôtes parmi différents écosystèmes ; (iii) identifier l'influence de la ressource alimentaire, des paramètres environnementaux et du microbiote sur la compétence vectorielle observée en condition naturelle ; (iv) caractériser l'origine du microbiote (environnementale ou génétique) de nos hôtes en milieu naturel. L'étude des liens entre le microbiote de ces organismes et leur capacité vectorielle initialement prévu dans le cadre de cette thèse, n'a toutefois pas pu être abordée par manque de temps. Toutefois, ces études sont en cours de réalisation dans le cadre d'autres projets de recherche et dans lesquels je suis également impliquée.

Le second axe s'est concentré sur les moustiques et nous a permis d'établir de manière directe, en conditions contrôlées au laboratoire, les liens entre diète et compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* pour deux arbovirus d'intérêt majeur en santé publique ; le chikungunya et la dengue. Pour ce faire, nous avons : (i) manipulé la diète végétale des moustiques vecteurs afin de

comprendre son impact sur le microbiote et sur la compétence vectorielle ; (ii) mis en place un outil permettant d'identifier la diète de nos moustiques.

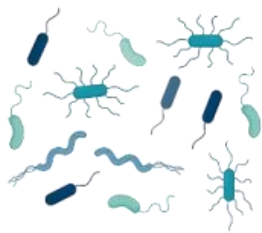
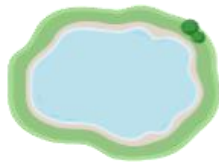
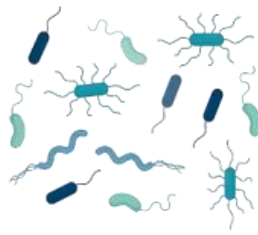
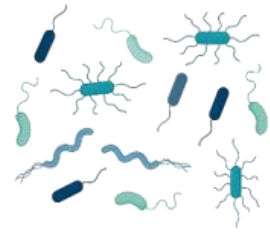
Dans le premier chapitre, j'aborde le suivi spatial de différentes communautés de *B. truncatus* au Sénégal, réparties sur neuf sites écologiquement contrastés. J'y explore la dynamique spatiale de leur microbiote bactérien, que je compare à celle des communautés bactériennes environnementales. Je fais également le lien avec la génétique des hôtes et la distance géographique, révélant un schéma d'isolement par la distance. Par cette approche, mes résultats suggèrent que le microbiote de *B. truncatus* en milieu naturel est principalement influencé par des facteurs génétiques. Ce chapitre intègre un article scientifique en révision dans la revue 'Molecular Ecology'.

Dans le second chapitre, je présente une étude réalisée en laboratoire visant à explorer le lien entre alimentation végétale et compétence vectorielle du moustique *Ae. albopictus* pour les virus du chikungunya et de la dengue. Nous y explorons plusieurs mécanismes non mutuellement exclusifs tels que la modulation par les plantes du (i) microbiote, (ii) la performance des moustiques (au travers leur survie) ou (iii) des différences dans les inocula viraux (au travers de la taille du repas de sang), qui pourraient influencer cette compétence.

Sur la base de l'ensemble de ces travaux et d'autres en cours de valorisation et présentés en annexes, je propose ensuite une discussion qui explore les perspectives de recherche pour approfondir notre compréhension des mécanismes impliqués dans l'émergence et la réémergence des maladies infectieuses, ainsi que dans l'origine des microbiotes.

Les objectifs, en bref :

- Caractériser le microbiote bactérien de *B. truncatus* dans des environnements naturels contrastés et évaluer la part des déterminismes environnementaux et génétiques sur cette structure du microbiote.
- Évaluer un potentiel lien entre paramètres environnementaux et microbiotes ; puis entre le microbiote et différentes plasticités dans la compétence vectorielle, *in natura*
- Évaluer le lien entre diète, microbiote et compétence vectorielle, en conditions contrôlées de laboratoire chez *Ae. albopictus*
- Développer un nouvel outil méthodologique basé sur le métabarcoding permettant de caractériser, à partir d'un moustique capturé sur le terrain, son espèce ainsi que les plantes et les hôtes vertébrés sur lesquels il s'est nourri.



Chapitre 1

Suivi de la dynamique spatiale du microbiote de
Bulinus truncatus au Sénégal et exploration de son
origine

I. Contexte et objectifs

Jaquet M.J., Douchet P., Toulza E., Lefèvre T., Senghor B., Boissier J., Lepais O., Chancerel E., Gourbal B., Rey O. (2024). Evidences that host genetic background more than the environment shapes the microbiota of the snail *Bulinus truncatus*, an intermediate host of *Schistosoma* species. Soumis à Molecular Ecology, en révision.

<https://doi.org/10.22541/au.172924412.20944268/v1>

Les objectifs de ce premier chapitre sont i. de caractériser la composition et la structure spatiale du microbiote de populations naturelles de bulins, hôtes intermédiaires de plusieurs espèces de *Schistosoma*, dans des écosystèmes naturels contrastés; et ii. d'identifier les facteurs qui structurent le microbiote des populations naturelles de bulins Ce chapitre fait l'objet et est présenté sous forme d'un article scientifique.

Comme mentionné en introduction, au commencement de cette thèse, peu d'éléments étaient connus sur le microbiote des gastéropodes, et plus particulièrement en population naturelle. Dans le cas de *B. truncatus*, seule une étude avait caractérisé les communautés bactériennes associées à des lignées de laboratoire (Huot *et al.* 2020). La souche de laboratoire de *B. truncatus*, initialement originaire d'Espagne et maintenue depuis plusieurs générations au laboratoire IHPE, a été comparée au microbiote d'autres souches de *Planorbidae* élevées en laboratoire. Les auteurs ont utilisé le séquençage de l'ADN ribosomal 16S pour caractériser le microbiote. Ils ont démontré que la composition bactérienne est hautement spécifique à chaque souche d'escargot, avec une variation interindividuelle limitée au sein de chaque souche. Ils ont également montré une correspondance complète entre la phylogénie des hôtes et la composition de leur microbiote, indiquant un schéma de phyllosymbiose, où les relations évolutives entre les hôtes se reflètent dans la composition de leurs microbiotes. Enfin, malgré une expérience d'élevage en jardin commun de deux mois, chaque gastéropode a conservé son microbiote spécifique, confirmant cette spécificité des communautés liée à l'espèce. En dehors de ces travaux, il n'existe aucune étude sur le microbiote de *B. truncatus*.

La première étape de mes travaux a donc consisté à caractériser la structure spatiale du microbiote des bulins dans des écosystèmes naturels contrastés. Ces écosystèmes présentent des paramètres biotiques et abiotiques variés pouvant conduire à des microbiotes différents chez les hôtes. Le deuxième objectif de ce chapitre est d'explorer les déterminants de la structure du microbiote des populations naturelles de bulins. En effet, ce dernier peut être conditionné par des

facteurs intrinsèques aux hôtes et notamment leur composition génétique mais également par des facteurs extrinsèques à l'hôte tel que l'environnement dans lequel il se trouve. L'ensemble de ces travaux a été soumis à la revue à comité de lecture *Molecular Ecology* et est actuellement en révision. Cet article est présenté ci-dessous tel qu'il a été soumis.

Publication n°1

Evidence that host genetic background more than the environment shapes the microbiota of the snail *Bulinus truncatus*, an intermediate host of *Schistosoma* species.

Mathilde J. Jaquet ^{1,2}; Philippe Douchet ¹; Eve Toulza ¹; Thierry Lefevre ²; Bruno Senghor ³; Jérôme Boissier ¹; Olivier Lepais ⁴; Emilie Chancerel ⁴; Benjamin Gourbal ¹; Olivier Rey ¹

¹ IHPE, UMR5244, Université de Perpignan Via Domitia, CNRS, IFREMER, Université de Montpellier, 66860, Perpignan, France

² MIVEGEC, Université de Montpellier, IRD, CNRS, 34394, Montpellier, France

³ VITROME, Campus International IRD UCAD de l'IRD, 1386 Dakar, Senegal

⁴ Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, 33610, Cestas, France

Key-words: *Bulinus truncatus*, Microbiota, Spatial structure, Population genetics, Trematodes, Multiple regressions on distance matrices

Abstract:

Microbiota are increasingly recognized as key players in regulating host biological functions, influencing both the ecology and evolution of organisms. However, the factors shaping microbiota diversity and structure in natural environments remain underexplored, especially the relative importance of host genetics versus environmental factors. In this study, we address this gap using the freshwater snail *Bulinus truncatus*, an intermediate host for some human and animal *Schistosoma* parasites, as a model species. We developed 31 new microsatellite markers to assess the population structure of *B. truncatus* across 9 sites in Senegal. We then applied metabarcoding to characterize the diversity and structure of individual snail bacterial microbiota and environmental communities associated with each sampling site using environmental DNA. We also used molecular diagnostics to determine trematode infection status of *B. truncatus* individuals. By integrating these data through multiple regression on distance matrices (MRM) analyses, we quantified the influence of *B. truncatus* population genetics, spatial distribution, environmental bacterial communities, and infection status on the snail's microbiota structure. Our results show that the genetic structure of *B. truncatus* populations, and to a lower extent geographic distribution, are the main factors explaining the snail's microbiota compositions. Neither the environmental bacterial communities nor trematode infection status significantly contributed to microbiota structure. A portion of the variance in microbiota composition remains

unexplained, suggesting that additional ecological or intrinsic factors might be involved. These findings provide new insights into the drivers of microbiota structure in natural populations and highlight the complexity of host-microbiota-environment interactions.

Data availability statement

All sequence data generated have been submitted to the Sequence Read Archive of NCBI.

Funding statement

This work was funded by the MICROVECT Project (défi clé RIVOC Occitanie Region, University of Montpellier); the European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP2) program. and by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety. This study is set within the framework of the “Laboratoire d’Excellence (LabEx)” TULIP (ANR-10-LABX-41) and LabEx CeMEB (ANR-10-LABX-04-01).). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest disclosure

The authors have no conflict of interest to disclose.

Ethics approval statement

The project has received approval from the National Ethical Committee (CNERS) of Senegal (agreement number: 00061/MSAS/CNERS/SP).

1. Introduction

The 'microbiota', consisting in all microorganisms associated with a host, is now broadly acknowledged as a crucial factor in various aspects of organismal biology, encompassing developmental, physiological, reproductive, behavioral and immune phenotypes (Liberti and Engel 2020; Daisley et al. 2020; Yuan et al. 2021; Davidson et al. 2024). The microbiota therefore partly influences the ecology and the evolution of their hosts and that of biotic interactions between host species (Sharon et al. 2010; Henry et al. 2021; Lange et al. 2023). Despite recent efforts to understand the factors shaping host microbiota, identifying and understanding the ecological and evolutionary determinants of microbiota composition and structure in natural host populations remains a major scientific challenge.

The composition and structure of natural hosts' microbiota is particularly complex and depends on multiple environmental and host genetic factors (Benson et al. 2010). On one hand, the microbiota is partly composed of some either obligatory or facultative symbionts that are transmitted, generally via maternal inheritance, from one host generation to another (Funkhouser and Bordenstein 2013). Their evolutionary history hence follows that of their hosts with which they have co-evolved at both macroevolutionary and microevolutionary timescales leading to phylosymbiosis (Kohl 2020; Dapa et al. 2023). These microorganisms constitute the 'core microbiota' which consists of species consistently associated with the host regardless of environmental conditions (Risely 2020). Accordingly, the composition and structure of hosts' microbiota is expected to be partly shaped by a combination of stochastic (e.g. dispersal, drift) and deterministic (e.g. selection) processes associated with hosts ecology and evolution (Benson et al. 2010; Furman et al. 2020; Hayashi et al. 2024).

On the other hand, most microorganisms that constitute hosts' microbiota are facultative and are acquired from the environment throughout the host's lifelong development. This is well illustrated by some species of Lepidopteran that lack a resident microbiota and generally acquire bacterial communities from their host plants or from the environmental microbial communities (Montagna et al. 2016; Phalnikar et al. 2018; Minard et al. 2019; Liu et al. 2020). Moreover, several environmental biotic factors including the communities of free-living microorganisms present in the environment (Díaz-Sánchez et al. 2018), and abiotic factors (e.g. temperature, pH) can influence the composition of the hosts' microbiota which can in turn modify hosts biology (Bernardo-Cravo et al. 2020). In other words, the ecology of hosts (e.g. behavior, diet) also influences their microbiota (Archie and Tung 2015; Kennedy et al. 2020). Thus, it is expected that organisms from a common genetic pool and established in different environments harbor different communities of microorganisms (Berg et al. 2016). Accordingly, part of hosts' microbiota is also expected to be partly shaped by ecological stochastic and deterministic (e.g. niche-based)

processes (Hayashi et al. 2024). This more flexible microbiota compartment which includes taxa that are stable or predictable over time within individuals or across populations and is called the 'temporal/dynamic core microbiota' (Risely 2020). This more flexible microbiota compartment which includes taxa that are stable or predictable over time within individuals or across populations and is called the 'temporal/dynamic core microbiota' (Risely 2020). Our comprehension of factors shaping hosts' microbiota hence requires accounting for the ecological context in which hosts are established and the genetic background of host populations.

Surprisingly however, few studies have yet specifically investigated the relative contribution of organisms' genetic diversity and that of their environment in shaping natural hosts' microbiota and lead to distinct conclusions. For instance, Suzuki and collaborators found that the structure of gut microbiota of wild house mouse (*Mus musculus domesticus*) populations is well predicted by genetic distances between host populations computed from an extensive exome genomic dataset and not by different environmental conditions, including temperature and diet (Suzuki et al. 2019). Conversely, the structure of the gut microbiota associated with California voles (*Microtus californicus*) populations across a contact zone between two recently diverged lineages of this species was best explained by the spatial distribution of hosts and not by lineage divergence, hence suggesting a strong influence of the environment on the structure of voles' gut microbiota (Lin et al. 2020). In the same vein, Rothschild et al. (2018) found that the genetic background among 1046 healthy human individuals have minor role in determining individuals' gut microbiota while environmental factors such as housing, diet and anthropometric measurements can explain some of the inter-individual variability in microbiota (Rothschild et al. 2018). Finally, in the *Nematostella vectensis* sea anemone model, Fraune et al. (2016) have shown that both the environment and genetics play a role in shaping the microbiota, and that these elements are complexly interconnected (Fraune et al. 2016). In the light of these studies, it appears that the importance of the genetic and environmental determinants of microbiota are potentially species and/or context dependent.

Here, we took advantage of high-throughput sequencing technologies to identify and assess the relative contribution of the ecological and host genetic factors structuring the microbiota associated with natural populations of the freshwater snail *Bulinus truncatus* as a model. *Bulinus truncatus* constitutes the main intermediate host for several trematode species including *Schistosoma haematobium*, the parasite responsible for urogenital bilharziasis in human populations in Africa (Toledo and Fried 2014). Ecological studies aimed at characterizing the communities of microorganisms associated with natural snail populations have recently flourished, especially in freshwater snails that are associated with disease transmission (Li et al. 2023). Based on cultivation-independent molecular methods, Van horn et al. (2012) have shown

highly diverse intestinal microbial communities among three freshwater planorbid snails collected from the field and two of which serve as intermediate hosts of several parasites including digenetic trematodes of the genus *Schistosoma* the etiologic agent of Schistosomiasis (Van Horn et al. 2012). Similarly, Huot et al. (2020) demonstrated that seven species and strains of *Planorbidae* exhibited highly specific core bacterial compositions that are closely related to the host strain. This bacterial composition shows high congruence with the host phylogeny, hence revealing a phylosymbiotic pattern (Huot et al. 2020). More recently, (McCann et al. 2024), showed that the microbiota of *Galba truncatula*, the main intermediate host for the zoonotic trematode *Fasciola hepatica*, vary between natural populations established at two geographically and ecologically distinct sites, hence highlighting the existence of natural diversity in the composition of bacterial communities associated with this snail species. However, whether such microbiota diversity in natural populations is driven by snails' genetic background or by environmental factors remains to be fully elucidated. If the freshwater snails' microbiota is important in the circulation of associated pathogens, as has been suggested, it is essential to study the natural diversity, the structure and the factors structuring these communities in the field.

Here, we characterized the diversity and structure of the whole-body *B. truncatus* microbiota over 9 freshwater aquatic sites in Northern Senegal. The presence of trematodes developing within each snail was molecularly diagnosed and the genetic background of each snail host was characterized based on 31 newly developed microsatellite markers using a genotyping-by-sequencing approach. Aquatic bacterial communities associated with each of the 9 studied freshwater sites were also characterized and used as a proxy of the ecological context in which *B. truncatus* populations are established. We used these complementary datasets to identify the main factors structuring the microbiota associated with *B. truncatus* in natural populations.

2. Materials and Methods

2.1. Field collection of samples

Field sampling was conducted in February 2022 during the dry season in the Senegal River basin region (**Fig. 1**). We focused on nine natural sites of *S. haematobium* transmission, where urogenital schistosomiasis' prevalence among school-aged children was previously reported (Senghor et al. 2022). These sites differ in terms of ecological contexts and in terms of *B. truncatus* abundance (Douchet *et al.* 2024). Six transmission sites are located near the villages of Ndiawara, Ouali Diala, Dioundou, Fonde Ass and Khodit, all of which being located along river "le Doue", a tributary of the Senegal River in the middle valley. One transmission site, near the village of Guia, is also located in the middle valley and consists of an irrigation canal that drains water from the

river “le Doue”. Two transmission sites, near the villages of Mbane and Saneinte are located along the east shore of Guiers lake. One transmission site near the village of Lampsar is located in the lower valley and consists of an inlet of the Senegal River delta (**suppl. Table 1**).



Figure 1: Locations of the studied aquatic transmission sites (black dots) nearby the closest established villages, on a satellite map of northern Senegal.

2.1.1 Field collection of environmental samples

At each site, we first filtered water along the water column from the surface to the water-sediment interface. We used filtration capsules of 0.45 μm mesh size (Waterra USA Inc.) connected to an electric water pump as previously described in Douchet and collaborators (Douchet *et al.* 2022). Filtration was performed until the filtration capsule was clogged and the final filtration volume was retrieved. Once the filtration completed, the filtration capsule was depleted from its water content, filled with 50 mL of Longmire solution, vigorously shaken, and preserved at ambient temperature until used for environmental DNA (eDNA) extractions. At each site but Khodit, a technical field negative control was obtained by filtering 1.5L of commercial spring water, following the same protocol for preservation.

2.1.2 Field collection and preservation of snails' samples

Following eDNA sampling, we manually collected all encountered aquatic snails by scooping the aquatic vegetation using a colander for about 30 minutes to 1 hour, along a 10 to 30-meters long transect along the shore of the targeted waterbody (either a river or a lake). After taxonomic identification (following the keys of (Mandahl-Barth 1962)), up to 17 non-emitting *B.*

truncatus snail were extracted from their shell, after a quick heating step at 70°C for 1 minute, with decontaminated forceps and individualized into a sterile 1.5ml tube containing 70% Ethanol. Forceps were decontaminated between each sample using a DNA AWAY solution. The extraction of snail bodies from their shells was achieved to avoid DNA contamination with microorganisms, including bacteria, established on snail shells. Overall, 124 (mean = 14; min = 5; max = 17; suppl. Table 1) adult *B. truncatus* snails that displayed a shell size of approximately 6 mm long, were prepared as above.

2.2. DNA Extraction from eDNA samples and *B. truncatus* snails

All pre-PCR steps including DNA extraction and the preparation of PCR mixes were conducted under a sterile hood decontaminated before and after each use with 10% bleach, 70% ethanol, a DNA AWAY solution followed by a UV light exposure for 20 minutes.

Total eDNA from water filtrations were extracted following (Douchet et al. 2022). Briefly, the Longmire buffer contained within each filtration capsule was equally split into three 50 mL tubes. For the field negative controls (i.e. Spring water filtrates), each capsule content was recovered in one single 50 ml tube. The tubes were centrifuged for 20 min at 16,000 x g and the supernatant was discarded. We then collected up to 1g of sediment from the pellet from each tube or 500 µl of Longmire remaining at the base of the tube when not enough material was observed. Thus, total eDNA from each capsule was extracted in triplicate. No pellets were observed for filtration negative controls (consisting in spring water) after centrifugation. For these samples, 500 µL of Longmire were retained and resuspended after removing the supernatant and were processed as the other samples. This step led to the processing of 35 samples (i.e. 3 extraction replicates for each of the nine eDNA samples and one field negative control per site except for Khodit). The total eDNA of these 35 samples was extracted using the DNeasy PowerSoil Pro kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol performing the physical lysis with a MagNA Lyser at a speed of 7000 × g for 30 s.

Total genomic DNA from each of the 124 snails removed from their shell was extracted using DNeasy 96 Blood and Tissue Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Two negative control extractions consisting of empty 1.5 ml tubes same as those used for snail preservation were added in the process.

2.3. Infection status and genotyping of *B. truncatus* snails

2.3.1. Infection status of *B. truncatus* snails

The presence of developing trematodes within each of the 124 snails was diagnosed using the Trem_16S_F1 (GACGGAAAGACCCCRAGA) and Trem-16S_R2 (CRCCGGTYTTAACTCARYTC-AT) 16S trematode metabarcode (Douchet et al. 2022). DNA extracts were diluted to 1/100th to minimize PCR inhibitors and hence limit PCR false negatives. PCR reactions were prepared and run under standard conditions, with detailed methodologies provided in Appendix 1. Positive samples were reamplified and sent to the Bio-Environment platform (University of Perpignan Via Domitia, France) to identify the trematodes potentially developing within snail hosts and accounting for possible coinfections. Libraries were performed using Illumina Nextera index kit and Q5 high fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Indexed PCR products were then normalized with SequalPrep plates (ThermoFisher) and paired-end sequenced on a MiSeq instrument using v2 chemistry (2 x 250 bp).

2.3.2. Microsatellite development

The *B. truncatus* genome (GenBank accession GCA_021962125.1, (Young et al. 2022)) was used for microsatellite discovery, leading to the selection of 96 primer pairs optimized for multiplex PCR (details in Appendix 2).

2.3.3. Sequence-based microsatellite genotyping

Multiplex PCR amplification and sequencing libraries were constructed, with detailed methods provided in Appendix 3.

2.3.4. Genetic analyses

Descriptive statistics of genetic diversity including the mean number of alleles, the mean allelic richness (computed based on the minimal number of genotypes obtained over sampling sites, $N = 5$), the mean expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosity, and the mean F_{is} were computed at each sampling sites using the SPAGeDi software (v. 1.5d; (Hardy and Vekemans 2002)) accounting for the allotetraploidy nature of *B. truncatus* (Njiokou et al. 1993).

We next computed pairwise Nei's genetic standard distance D_s (Nei 1978) and F_{st} values between each sampling sites using the SPAGeDi software (v. 1.5d; (Hardy and Vekemans 2002)). From the obtained D_s values, we ran a Mantel test to test for possible isolation by distance pattern among sampling sites using matrices of pairwise D_s values and pairwise linear geographical distances obtained between each sampling site. The statistical significance of the Mantel

coefficient r was tested based on 10000 permutations as implemented in the 'ade4' R package (Jombart 2008). A similar Mantel test analysis was run using pairwise ($F_{st} / (1 - F_{st})$) values obtained between sampling sites.

2.4. Sequencing of bacterial communities and metabarcoding analyses

A total of 198 bacterial 16S metabarcoding libraries were prepared following the Illumina two-step PCR protocol; including the DNA extracts of the 124 snails, 70 eDNA replicates consisting in 54 eDNA samples (each extraction triplicate was amplified in duplicate) and 16 technical field negative controls (each control was amplified in duplicate), and 4 negative PCR controls (millip water) (suppl. Table 3). We targeted the variable V3-V4 loops region of the 16S rDNA gene using the 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') primers (Klindworth et al. 2013) combined with universal Illumina adapters.

The first PCRs were performed using the Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England BioLabs), in a 25µL final volume containing 2 µL of template DNA and using a PCR program consisting in an initial denaturation step of 30s at 98°C followed by 32 cycles containing a denaturation step of 6 sec at 98°C, an annealing step of 30 sec at 55°C, and an elongation step of 8 sec at 72°C and ending with a final elongation step of 60 sec at 65°C. We used 5 µL of the PCR products to check the PCR products quality and integrity through electrophoresis on agarose gels. The 20µL left were sent to the Bio-Environment platform (University of Perpignan Via Domitia, France). Libraries were performed using Illumina Nextera index kit and Q5 high fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Indexed PCR products were then normalized with SequalPrep plates (ThermoFisher) and paired-end sequenced on a MiSeq instrument using v2 chemistry (2 x 250 bp).

Raw data were processed using R (version 2023.03.0+386) using a pipeline based on the 'dada2' package (v. 1.28.0) (Callahan et al. 2016) on the IFB (French Institute of Bioinformatics) cloud. Briefly, this pipeline consists in removing primers from the obtained sequenced reads (max.mismatch = 1), trimming and quality filtering reads (minLen = 150, maxN = 0, maxEE = c(3, 3), truncQ = 2), denoising, dereplicating, merging paired-end reads (maxMismatch = 0), building the Amplicon Sequence Variant (ASV) table and removing potential chimeric sequences produced during the process (method = 'consensus'). The taxonomic assignment (multithread = TRUE, minBoot = 60) of the resulting filtered and cleaned ASVs was performed using the Ribosomal Database Project (RDP) classifier (Wang et al. 2007) and based on the Silva_train_set and silva_species_assignment 138.1 datasets (Quast *et al.* 2012). Eukaryotic, mitochondrial, and chloroplast sequences were removed, as well as ASVs not affiliated to 'Bacteria' at the Kingdom taxonomic levels. The obtained ASV sequence table was finally merged with the taxonomy

database and the sample metadata matrix for subsequent analyses using the 'phyloseq' R package (v. 1.22.3) (McMurdie and Holmes 2013).

The final ASV dataset was next cleaned from possible contamination during field collection and biomolecular processing (DNA extraction, PCR). To this aim, ASVs obtained from negative PCR controls were removed from all samples through the 'prune_taxa' function of the 'phyloseq' package. Then, the 'merge_phyloseq' function of the 'phyloseq' package was used to generate the whole object containing all the samples. Moreover, ASV present at low abundance ($< 0.005\%$; (Bokulich et al. 2013)) were filtered from the whole dataset to account for possible sequencing errors. Briefly, the whole phyloseq object was transformed in relative abundance with the 'transform_sample_count' function of the 'phyloseq' R package. Then, the low abundant taxa were removed through the 'prune_taxa' function of the 'phyloseq' R package.

To assess whether sequencing depth was satisfactory across samples, rarefaction curves were generated using 'rarecurve' function from the 'vegan' R package (v. 2.6.4) (Oksanen et al. 2022). The abundance of each ASV was normalized based on the lowest sample in terms of ASV counts (i.e. 7000, see suppl. Table 3) by random sub-sampling using the 'rarefy_even_depth' function of the 'phyloseq' package (rngseed = 1000) (McMurdie and Holmes 2013). To quantify read counts per sample during preprocessing steps, refer to suppl. Table 3.

2.5. Statistical analyses

2.5.1. Diversity in environmental and snail-associated bacterial communities and characterization of *B. truncatus* core microbiota

The diversity of bacterial communities associated with environmental matrices and *B. truncatus* snails was assessed at the sampling site level based on the absolute number of ASVs, the Shannon and Simpson's diversity indices as implemented in the 'microbiome' R package (v. 1.22.0) (Lahti and Shetty 2012). Kruskal-Wallis nonparametric tests were computed to compare each of these alpha-diversity indices between sample type (i.e. snails versus eDNA samples) and between sites using the 'stats' R package (v. 4.3.0) (R Core Team 2023). Those tests were followed by pairwise multiple comparisons using the 'FSA::dunnTest' of the 'FSA' R package (v. 0.9.5) with the Benjamini-Hochberg method for adjusting p-values (Dunn 1964).

To characterize the core microbiota of *B. truncatus in natura*, which consists in the most stable part of the bacterial communities shared among all individuals (Risely 2020), we followed established guidelines (Neu et al. 2021). The core microbiota was assessed at the family level using the 'core_members' function of the 'microbiome' R package (Lahti and Shetty 2012) and setting the detection parameter to 0 and the prevalence parameter to 90%.

2.5.2. Identification of factors structuring environmental and snail bacterial communities

To investigate for possible structuration of bacterial communities in environmental samples and *B. truncatus* snails we conducted a Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the 'pco' function of the 'ecodist' package (v. 2.1.3) (Goslee and Urban 2007). Pairwise Jaccard and Bray-Curtis indices were conducted using the 'distance' function of the 'phyloseq' R package. Based on these beta diversity indices, we ran permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA) to test for: 1- Differences between aquatic bacterial communities (i.e. eDNA samples) and snails associated communities, accounting for the sampling site as an additional explanatory variable and for a possible interaction between sampling site and the nature of the sample (environment versus snail). 2- An effect of trematode infection status (all trematode species combined) on the difference in *B. truncatus* microbiota. Here we accounted for the sampling site as an additional explanatory variable and an interaction term between the sampling site and the infection status. PERMANOVA were conducted using the 'adonis2' function implemented in the 'vegan' R package (Oksanen et al. 2022), and setting the number of permutations to 10 000.

To assess the relative effect of the environmental bacterial communities and the genetic background of snails on whole-body snail microbiota, we tested for correlation between four pairwise matrices including, the geographical distance matrix between each sampling site, the Jaccard indices computed between environmental bacterial communities at each sampling site, the Jaccard indices computed between bacterial communities associated with *B. truncatus* individuals and the Nei's genetic distance between snail hosts. To ensure comparable dimensions for the four matrices, 14 samples from the original matrices were discarded using the 'subset_samples' function from the 'phyloseq' R package. This step led to two matrices of 109*109 dimensions. Based on those matrices, we pseudoreplicated the geographic distance and the Jaccard indices computed between environmental bacterial communities at each sampling site matrices to transform them in the same dimensions.

Based on these four matrices, we conducted a multiple regression on distance matrices (MRM) fixing the Jaccard distance matrix obtained from the bacterial communities between *B. truncatus* individuals as the dependent variable and using three matrices as explanatory variables: the Jaccard distance between bacterial communities at each site (pseudoreplicated at the individual level), the Nei's genetic distance computed between individuals and the euclidean geographic distance between sites (also pseudoreplicated at the individual level). This MRM analysis was ran using the 'MRM' function of the 'ecodist' R package and the significance of this multiple regression test was assessed based on 9999 permutations.

Results were visually assessed using a custom function to plot matrices against one another, with Mantel test statistics computed using the 'mantel' function of the 'vegan' R package.

3. Results

3.1. Abundance of *B. truncatus*, trematode prevalence among sites

Overall, from the 124 *B. truncatus* extracted from their shell, the total trematode infection prevalence was 15.3% ranging from 0% (Dioundou, Mbane, Saneinte) to 29.4% (Fonde Ass) (suppl. Table 1). Nine species of trematodes were identified. Aside from *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma bovis*, we also found *Haematolochus* sp., two species of Paramphistomoidea, *Orientocreadium batrachoides*, *Petasiger* sp. and two species of Diplostomoidea.

3.2. Genetic diversity and structure of *B. truncatus* among sampling sites

Based on the 31 newly developed microsatellite markers, we found little genetic diversity with little variation in genetic diversity among sites. Allelic richness (Ar) ranged from 2.13 (Dioundou) to 2.75 (Mbane) and observed heterozygosity (Ho) ranged from 0.38 (Ndiawara and Saneinte) to 0.41 (Guia and Mbane) (**Table 1**). Inbreeding coefficients (F_{is}) were different from zero for all but the two sites Mbane and Saneinte located on the Guiers lake. Pairwise D_s genetic distances computed between sites ranged from 0.0019 between Ndiawara and Dioundou both sites being located along the Doué river approximately 4.8 km one from each other; and 0.4354 between Ouali Diala (Doué River) and Lampsar distant by approximately 160.3 km. The observed genetic differentiation between sites followed an isolation by distance pattern (Mantel $r = 0.76$; $P_{val} = 0.0009$) (**suppl. Fig. 1**).

Table 1. Genetic diversity statistics for *B. truncatus* at each sampling site based on the 31 microsatellite markers developed in this study. Na: Number of alleles; Ar: Allelic richness; He: gene diversity (Nei 1978); Ho: Observed heterozygosity; Fis: Inbreeding coefficient; Pval of Fis after 10000 randomization of gene copies among individuals.

Site	Sample size	Na	Ar	He	Ho	Fis	Pval (Fis<>0)
Ndiawara	7	2.52	2.42	0.405	0.382	0.063	0.028
Ouali Diala	11	2.42	2.27	0.375	0.389	-0.042	0.054
Guia	16	2.58	2.21	0.384	0.406	-0.06	0.001

Dioundou	5	2.13	2.13	0.369	0.396	-0.087	0.011
Fonde Ass	15	3.06	2.53	0.417	0.39	0.069	0.001
Khodit	15	2.97	2.63	0.453	0.396	0.133	0
Mbane	12	3.23	2.75	0.401	0.41	-0.023	0.239
Saneinte	16	3.26	2.68	0.383	0.382	0.004	0.806
Lampsar	13	2.9	2.57	0.421	0.392	0.072	0
Overall sites	110	5.52	3.18	0.499	0.394	0.211	0

3.3. Diversity in environmental and snail-associated bacterial communities and characterization of *B. truncatus* snails' core microbiota

In terms of alpha diversity, the bacterial communities from the environment displayed equal alpha diversity among sites except for Lampsar that displayed lower alpha diversity whatever the index used (i.e. Species Richness, Shannon, Simpson) (**suppl. Fig. 2**). Moreover, *B. truncatus* microbiota displayed lower diversity than aquatic bacterial communities, except for the Lampsar site, when considering the ASV richness (Kruskall-Wallis chi squared = 95.394; Pval < 0.0001), the Shannon diversity index (Kruskall-Wallis chi squared = 92.187; Pval < 0.0001) and the Simpson index (Kruskall-Wallis chi squared = 89.132 ; Pval < 0.0001) (suppl. Fig. 2 and suppl. Table 4). We found significant differences in the mean alpha diversity indices in the microbiota of *B. truncatus* from the different sample sites (all p < 0.05, suppl. Table 5 and suppl. Fig. 3A). Pairwise post-hoc tests revealed that only the alpha diversity of the sampling site Mbane was lower than that of Saneinte ((Z = 6.78, Pval < 0.01), Guia (Z = 3.16, Pval = 0.014) and Lampsar (Z = 8.17, Pval < 0.01). Moreover, we found no significant differences in alpha diversity between infected and uninfected snails (all p > 0.05, suppl. Table 6 and **suppl. Fig. 3B**).

Proteobacteria were predominant in the microbiota of *B. truncatus* across all sampling sites, followed by Bacteroidota and Firmicutes (**Fig. 2A**). Among the phyla identified in the environmental samples, only two were common to both the snail microbiota and the environmental samples: Cyanobacteria and Planctomycetota (**suppl. Fig 4**). Cyanobacteria was the second most abundant phylum in the environmental samples, while Planctomycetota ranked seventh among the 28 phyla found. Interestingly, Planctomycetota were more abundant in the snail samples than in the environmental samples, whereas the opposite was true for Cyanobacteria.

The core microbiota of *B. truncatus* was characterized at the family level by considering bacterial families present in at least 90% of the overall snails. The core microbiota consisted of 6 families out of the 169 families identified in the snails. These families, which included

Chitinophagaceae (69.3% of core microbiota reads), Weeksellaceae (12.9%), Comamonadaceae (8.9%), Moraxellaceae (3.4%), Flavobacteriaceae (2.9%), and Pseudomonadaceae (2.6%), were common to at least 90% of individuals across all sampling sites, although their relative abundances varied (**Fig. 2B**).

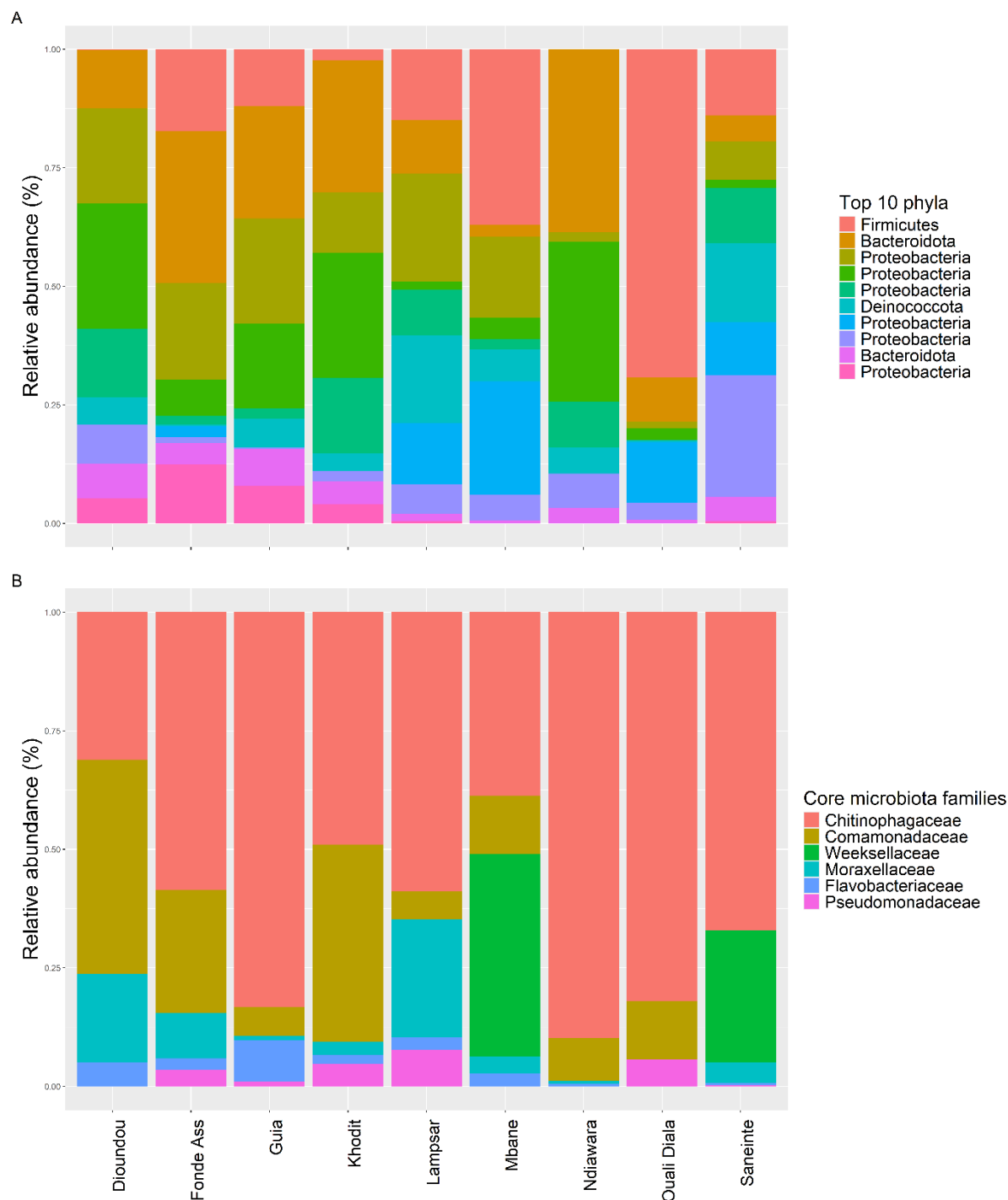


Figure 2: (A) Relative abundance of the ten most abundant phyla in the microbiota of *B. truncatus* from the nine different sites. (B) Bacterial composition of the core microbiota of *B. truncatus* snails at the family level across the 9 studied sites.

3.4. Identification of factors structuring environmental and snail bacterial communities

3.4.1. The microbiota of *B. truncatus* snails differs from environmental bacterial communities

Based on the microbial communities characterized from the 54 environmental samples and the 124 *B. truncatus* individuals, we found that the total microbiota associated with whole-body *B. truncatus* differs from bacterial communities present in the environment. The first two axes of the Principal Coordinates Analysis (PCoA) performed on the Jaccard distance matrix obtained among all samples (i.e. *B. truncatus* snails and environmental samples) and all sampling sites explained 21.83% of the total variance (**Fig. 3**). *Bulinus truncatus* and environmental samples cluster into two distinct groups along these two axes. Such difference in the composition in bacterial communities between the environmental samples and *B. truncatus* is confirmed by the PERMANOVA analysis which indicates significant effect of the type of sample (i.e. *B. truncatus* snail and environmental sample) (F-value = 39.44; Pval < 0.0001) and of the sampling site (F-value = 6.42 ; Pval < 0.0001). Similar results were obtained from the PERMANOVA analysis based on the Bray-Curtis distances (nature of the sample: F-value = 76.60 ; Pval < 0.0001; site: F-value = 10.66 ; Pval < 0.0001; **suppl. Fig. 5**).

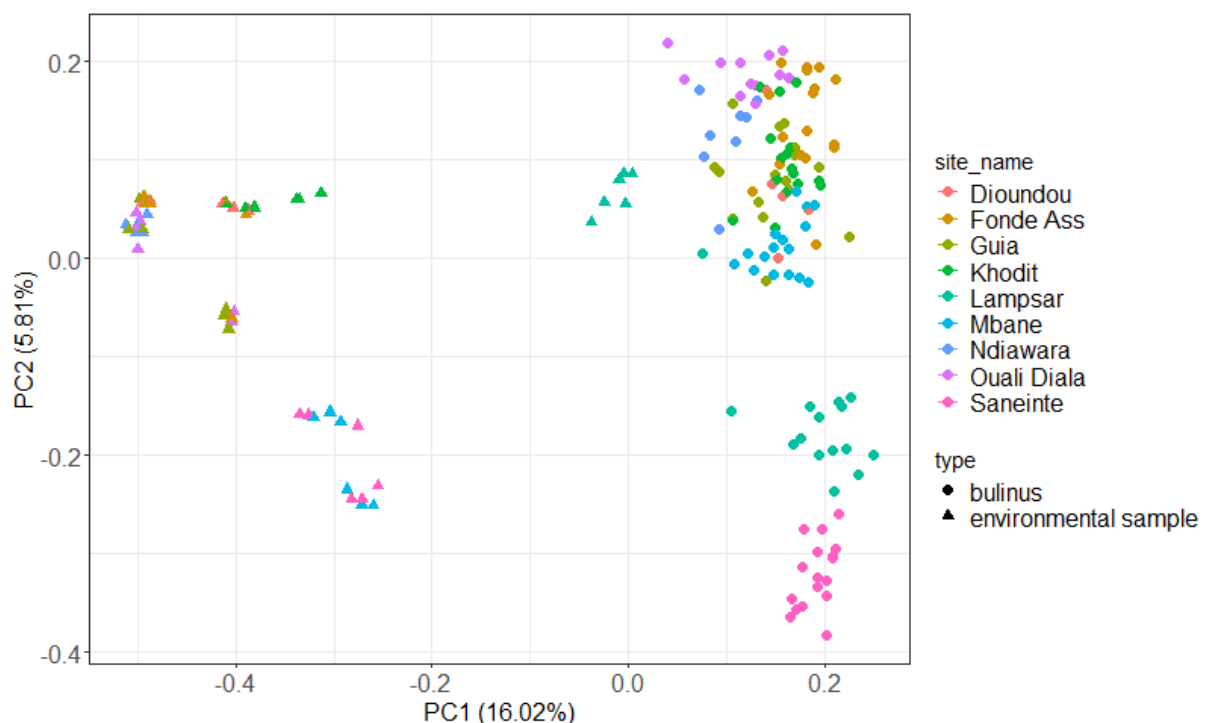


Figure 3: Principal coordinate analysis (PCoA) plot showing environmental samples (triangles) and *B. truncatus* snail associated (dots) bacterial communities distributed along the two first PCoA axes computed based on pairwise Jaccard distances obtained between each pair of samples.

3.4.2. The microbiota of *B. truncatus* snails is geographically structured, partly driven by their genetic background and the geographic distance and to a lesser extent by the environment.

The first two axes of the Principal Coordinates Analysis (PCoA) performed based on the Jaccard distance matrix obtained from *B. truncatus* microbiota explained 28.36% of the total variance (**Fig. 4**). Our PERMANOVA analysis supports an effect of the sampling site with the structure of *B. truncatus* microbiota (F-value = 7.84 Pval < 0.0001) (**Fig. 4**). The same results were observed using pairwise Bray-Curtis distances (F-value = 12.20; Pval < 0.0001, **suppl. Fig. 6**). Conversely, we found no effect of the infection status of *B. truncatus* on the beta diversity of snails' microbiota, neither based on the Jaccard distances (**Fig. 4**) nor based on the Bray-Curtis distances (all $p > 0.05$, **suppl. Table 7 and suppl. Fig. 6**) even when accounting for the effect of the sampling site.

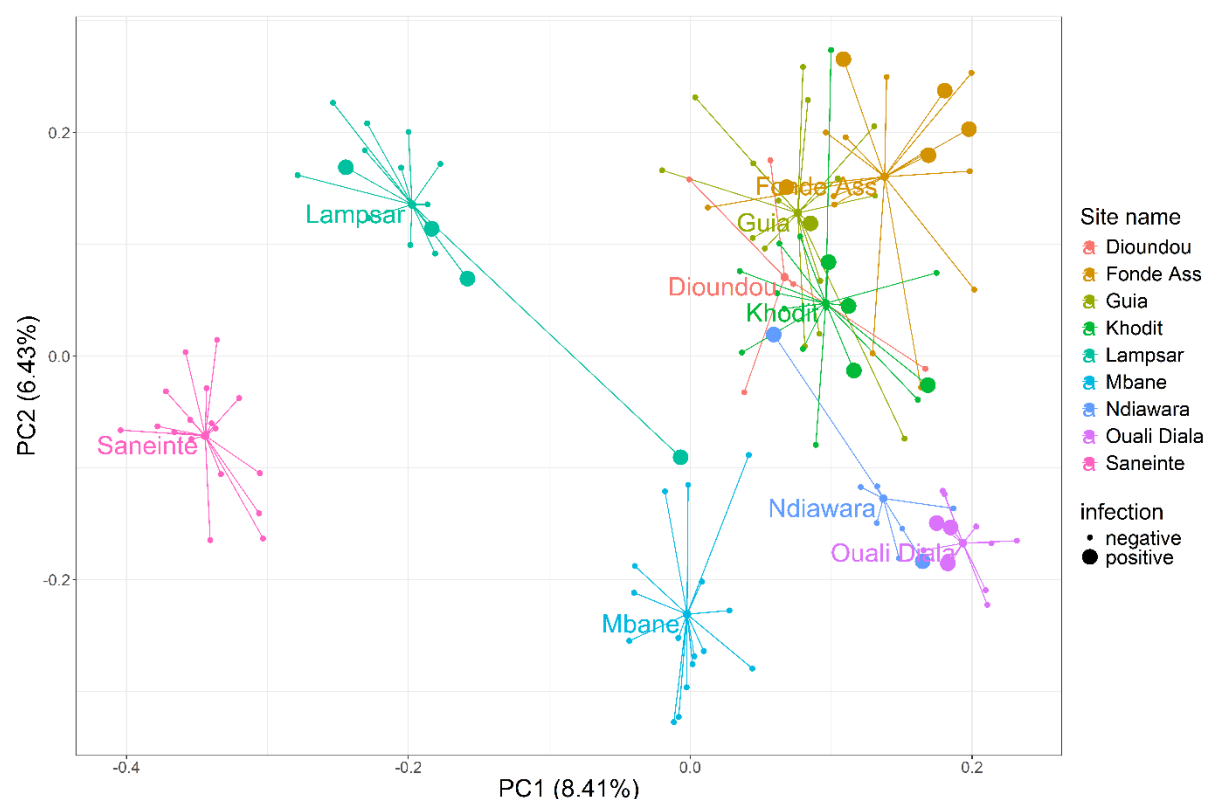


Figure 4: Principal coordinate analysis (PCoA) plot showing the bacterial communities of *B. truncatus* according to their original sampling sites (see color legend), and to their infection status

by trematodes based on a molecular diagnostic (dot size) distributed along the two first PCoA axes based on pairwise Jaccard similarity indices computed between each sample. Each colored small dot represents one snail host from a given sampling site. Large dots are snail hosts positive to trematode molecular diagnostic. Medium dots are the centroids of the bacterial communities of snails originating from each sampling site.

Based on the multiple regression on distance matrices (MRM) and on our series of correlation tests (**Fig. 5**), the variables that explain the mean Jaccard indices calculated between *B. truncatus* microbiota at the individual level are, in order of importance, the Nei's genetic distance between individuals ($r = 0.24$; $P\text{-value} < 0.001$), the geographical distance between sites ($r = 0.22$; $P\text{-value} = 0.001$) and the mean Jaccard indices calculated between the aquatic bacterial communities at the site level ($r = -0.05$; $P\text{-value} = 0.39$) both pseudo-replicated at the individual level.

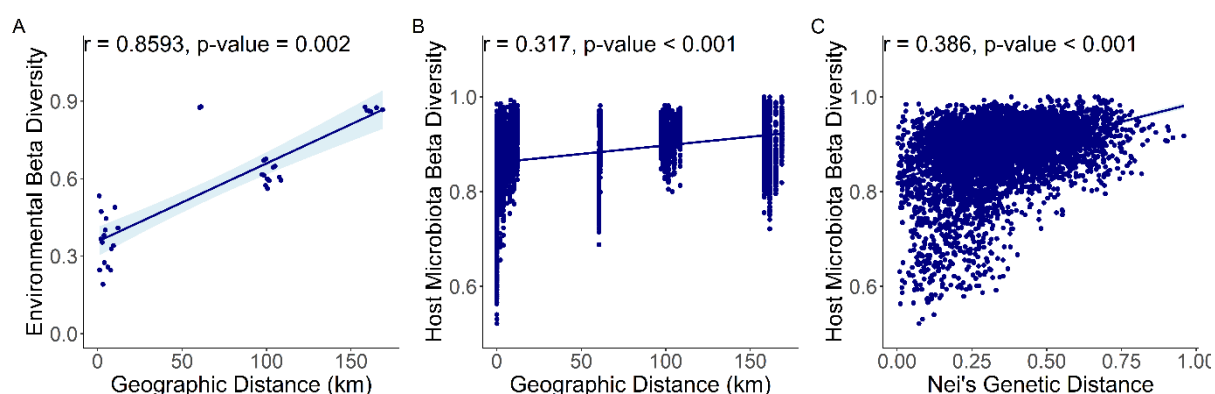


Figure 5: Distance-decay scatterplots showing bacterial communities distance (determined by the pairwise Jaccard similarity index) as a function of geographic distance across sampling sites for environmental samples (A), and *B. truncatus* snails (B). Scatterplot of *B. truncatus* snails microbiota dissimilarity (determined by the Jaccard index) as a function of Nei's genetic distance between *B. truncatus* individuals computed based on 31 microsatellite loci (C). Blue lines of best fit are included to highlight trends.

4. Discussion

1. Composition of the microbiota in natural populations of *B. truncatus*

1.a. Bacterial communities display lower alpha-diversity in *B. truncatus* than in environmental samples

Our results provide new insights on the composition of the microbiota associated with *B. truncatus* natural populations. Overall, *B. truncatus* display microbiota less diversified than bacterial communities present in the surrounding freshwater environment. This was somewhat expected because bacterial communities collected from the environment encompass free-living bacteria, bacteria that are released by all organisms associated with freshwater habitats and bacteria associated with freshwater microorganisms that could have been trapped during eDNA sampling (e.g. algae, invertebrates) (Mikhailov *et al.* 2019; Gendron *et al.* 2019; Sadeghi *et al.* 2021). Moreover, host microbiota are generally considered as a subsample of environmental bacterial communities resulting from a filter induced by the intrinsic properties of the hosts (Reese and Dunn 2018; Mazel *et al.* 2018; Suzzi *et al.* 2023). In particular, the host constitutes an ecological niche, which suitability for bacteria is largely influenced by hosts immune system that acts as a selective pressure, promoting the growth of some beneficial bacteria while inhibiting potential pathogens and maintaining the microbiota homeostasis (Belkaid and Harrison 2017). Such lower alpha-diversity in host microbiota compared to environmental bacterial communities was also described in recent studies conducted on other freshwater snails including *Ampullaceana balthica* and *Galba truncatula* (Herlemann *et al.* 2024; McCann *et al.* 2024).

We found only little inter-site differences in *B. truncatus* microbiota alpha diversity among the nine sampling sites. The microbiota of *B. truncatus* from only one site (i.e. Mbane) harbored lower alpha-diversity than two other sites (i.e. Saneinte and Lampsar). The low alpha diversity of *B. truncatus* microbiota observed in Mbane comparatively to those of Saneinte is intriguing since these two sites are geographically distant from only 3.2 km and established along the same shore of the Guiers Lake. In our study, no obvious technical (e.g. difference in sequencing coverage), or measured biological factors (e.g. host size, host genetic diversity), can satisfactorily explain this pattern either at an individual or site scale (data not shown). Ecological differences between these two sites, and in particular in terms of food resources available for local *B. truncatus* populations, could be one explanatory factor explaining such difference, although we did not collect this information in the field. Studies have suggested that, additionally to host physiological traits, dietary diversity (exogenous microbial diversity) also impacts gut microbiota alpha diversity (Reese and Dunn 2018). Fine-scale geographical studies at the scale of the lake accounting for more detailed ecological factors can be useful to better understand such results.

1.b. *Bulinus truncatus* microbiota composition in natural populations

We observed that Proteobacteria, Bacteroidota, and Firmicutes were the dominant phyla in the microbiota of *B. truncatus* across all sampling sites. Among the top 10 bacterial phyla identified in *B. truncatus*, two were also found in the aquatic bacterial communities: Cyanobacteria and Planctomycetota. Cyanobacteria was the second most abundant phylum in the water samples, while it ranked third among the top 10 phyla and seems less abundant in *B. truncatus*. Conversely Planctomycetota, which ranked seventh out of the 28 total phyla in the water samples, was significantly enriched in *B. truncatus* snails. This strengthens the idea that the snails may act as a narrower niche than aquatic environments, selecting only some bacteria from the environment (Suzzi *et al.* 2023; Herlemann *et al.* 2024).

At the family level, the ‘common’ core microbiota of *B. truncatus* included Chitinophagaceae, Weekselaceae, and Flavobacteriaceae that all belong to the Bacteroidota phylum, as well as Comamonadaceae, Moraxellaceae, and Pseudomonadaceae belonging to the Proteobacteria phylum. Interestingly, Proteobacteria, Bacteroidota and Firmicutes were previously detected as major bacterial taxa in a pool of *B. truncatus* initially originating from Spain and maintained in the laboratory for several generations (Huot *et al.* 2020). In particular, Flavobacteriaceae, Comamonadaceae and Pseudomonadaceae are families that are shared by this laboratory reared Spanish *B. truncatus* strain and all natural *B. truncatus* populations from northern Senegal studied here. These bacteria are likely to display important functions for the development of *B. truncatus*. In this regard, members of the Comamonadaceae family are known for their denitrifying activities and their action in the sulfur cycle (Khan *et al.* 2002; Wu *et al.* 2018). Pseudomonadaceae family, apart from containing pathogen bacteria for humans, can exhibit antimicrobial activity, help in nitrogen fixation and produce antifungal compounds (Fukuda *et al.* 2021; Saati-Santamaría *et al.* 2021). Pseudomonadaceae are also able to degrade all sort of complex molecular compounds including aromatic nucleus leading to break down environmental pollutants such as phthalates, hydroxybenzoates, and toluene (Parales and Harwood 1993; Przybylińska and Wyszowski 2016).

Conversely, some bacterial families were found only in this study and were absent or present at low abundance in the previously studied *B. truncatus* laboratory strain. In particular, the Chitinophagaceae family, as their name implies, can hydrolyze chitin from the environment and are found primarily in soils and aquatic sediments (Lim *et al.* 2009; Madhaiyan *et al.* 2015). Under natural conditions, *B. truncatus* feed on recalcitrant food resources including detritus, decaying macrophytes, diatoms and filamentous algae, and thus potentially require a highly diverse microbial communities for digestion (Madsen 1992; Van Horn *et al.* 2012). In this regard, a reduction in the complexity of the food resource available for the laboratory population (i.e. organic washed lettuce) may also explain a relaxation of selection pressure and a loss of some

bacteria taxa involved in snails' digestion. Alternatively, although nonexclusively, the differences observed in the core microbiota between our *B. truncatus* field populations from Senegal and that of the Spanish laboratory strain may be a result of co-evolutionary processes driven in part by the evolutionary history of *B. truncatus* populations; the population established in Spain having probably diverged from the populations of Senegal for a long time. This latest hypothesis implies that the genetic structure of *B. truncatus* populations resulting from their evolutionary history influences the bacterial communities associated with these populations. This is precisely what our results show at the scale of northern Senegal, as we discuss in the next section.

2. Structuring factors of the microbiota of natural *B. truncatus* snails

Our results show that *B. truncatus* microbiota are well structured geographically although they display a less pronounced 'distance-decay' pattern than that of aquatic bacterial communities. Communities of free-living bacteria generally display such a pattern, although the robustness of the relationship may vary depending on the ecological context and the geographical scale (Clark *et al.* 2021). While the factors that lead to this 'distance-decay' pattern are still debated, it is accepted that it results at least from a limitation in the dispersion of bacterial communities and the heterogeneity of the environment (Green and Bohannan 2006; Sadeghi *et al.* 2021). We believe that, the strength of the 'distance-decay' pattern observed among aquatic bacterial communities in our study result from the fact that ecological heterogeneity and geographical distances between sites are tightly linked, with closer sites being associated to the same ecological system (e.g. lake de Guiers, River 'Le Doué'). The less pronounced 'distance-decay' pattern of *B. truncatus* microbiota observed here is in line with the recent study from Herlemann *et al.* conducted on the freshwater snail *A. balthica* in Northern Europe at a similar geographical scale (Herlemann *et al.* 2024). As the authors suggest in their model, we can here hypothesize that *B. truncatus* creates more uniform environments for their associated bacteria, compared to the heterogeneity of the aquatic environments where *B. truncatus* and aquatic bacterial communities are found. Another non-exclusive hypothesis would be that the structure of *B. truncatus* microbiota is determined by other predominant factors, and particularly some evolutionary factors specific to *B. truncatus* populations. In this respect, the MRM analysis shows that the genetic distance between *B. truncatus* hosts explains the beta diversity of their associated microbiota better (albeit slightly) than the geographical distance. This suggests that the evolutionary history of *B. truncatus* populations, which is strongly influenced by migration and drift as shown by the strong isolation by distance (IBD) pattern observed, is a key element in the structuring of *B. truncatus* microbiota. Thus, while phyllosymbiosis between snail species and their

microbiota is already documented at the inter-specific level (Huot *et al.* 2020; Schols *et al.* 2023), we here argue that phylosymbiosis could also occur at the intra-specific level.

The strong IBD pattern observed among *B. truncatus* populations was expected and fit well the results from previous genetic studies conducted on this species in different countries of Africa including Senegal. Early studies based on allozymes or a limited number of microsatellites have shown that self-fertilization is frequent in natural populations of *B. truncatus* (Njiokou *et al.* 1993; Jarne *et al.* 1994). On the other hand, populations of *B. truncatus* are often subjected to fluctuating episodes of extinction and recolonization that follow the alternation of wet and dry seasons that greatly shape the (sometimes temporary) habitats of this species. Episodes of extinction and recolonization by a small number of self-fertilizing individuals generally explain the low intra-site genetic diversity and genetic differentiation between populations, even if they are geographically close (Njiokou *et al.* 1993; Maes *et al.* 2022). Based on the 31 microsatellite markers newly developed in this study, we found no clear evidence of self-fertilization and the low values of genetic differentiation observed between geographically close populations suggest a non-negligible gene flow between these populations that tends to fade as the geographical distance between populations increases. We explain these results by the fact that all sites included in this study are permanent habitats with water present all along the year. This limits (but does not fully exclude) temporary population extinctions and allows populations to develop demographically, thus reducing the effect of genetic drift and potentially encouraging cross-fertilization. Moreover, water flow in the river Le Doué certainly promotes gene flow between geographically close populations and explains the little genetic differentiation observed between these populations. In this respect, it is interesting to note that the genetic markers used in this study reveal higher genetic differentiation between the population established in the Guia canal, which is fed and connected to the Le Doué River, compared to populations established along the Le Doué River at equal or greater geographical distances. Similarly, the sampling sites on the banks of Lake Guiers are only 3.2 km apart and it is likely that the sole effect of wind-generated surface currents facilitates gene flow between these two populations. Conversely, high values of genetic differentiation were observed between geographically distant populations and are in line with the genetic patterns recently documented on *B. truncatus* populations in the same region based on 10750 SNPs (Maes *et al.* 2022).

Combined together, the genetic structure of *B. truncatus* populations and the geographical distance between populations do not fully explain the structure of the microbiota of *B. truncatus* and other factors, probably ecological, which we missed in this study, are certainly at work in shaping the microbiota of *B. truncatus*. For example, low genetic differentiation and little

geographical distance clearly fail to explain the huge difference observed between the microbiota of *B. truncatus* established at the two sites along Lake Guiers (Saneinte and Mbane). Among the other potential structuring ecological factors that we investigated, the structure of aquatic bacterial communities does not predict the structure of *B. truncatus* microbiota when accounting for the genetic structure of *B. truncatus* populations and the geographical distances between sites. Thus, environmental bacterial communities do not directly influence *B. truncatus* microbiota. This was somewhat unexpected for at least two reasons. First, we might expect that some environmental bacteria are transferred to *B. truncatus* through several processes including ingestion during snail feeding or colonization of external snail tissues. Indeed, most freshwater snails are detritivorous or feed upon biofilms hence providing opportunity for different environmental bacteria to colonize and eventually establish within the gastrointestinal tract of snails established in different habitats (Madsen 1992; Van Horn *et al.* 2012; Kivistik *et al.* 2023). The lack of influence from aquatic bacterial communities on *B. truncatus* microbiota further supports the idea that *B. truncatus* acts as a filter for specific bacteria. This filtering effect, that might partly depend on the genetic background of *B. truncatus* lineages, limits the differences between the environmental bacterial communities that occasionally associate with *B. truncatus*. It is worth stressing that we here focused on *B. truncatus* whole microbiota and not specifically on the gut microbiota. By focusing only on these tissues, it is likely that we would have found a better congruence between environmental bacterial communities and *B. truncatus* gut microbiota. In fact, we did find some bacteria that are present both in the environment and in *B. truncatus* such as Chitinophagaceae as previously mentioned.

Finally, as part of the biotic environment, the presence of developing trematodes inside the snails does not seem to influence the snail microbiota although some infected *B. truncatus* displayed bacterial communities departing from those of non-infected sympatric congeners. In this respect, Portet *et al.* (2021) previously empirically showed that the experimental infection of laboratory-reared *Biomphalaria* snails by *Schistosoma mansoni* induced drastic modifications of snail microbiota soon after experimental infection, but that the microbiota gradually returns to its initial state a few days or weeks after. Consequently, it is likely that most *B. truncatus* diagnosed as infected with trematodes in our study had been infected for a sufficiently long time, allowing their microbiota to recover. Conversely, the rare infected *B. truncatus* displaying microbiota distinct from non-infected sympatric conspecifics could have been infected shortly before sampling. Alternatively, these individuals with different microbiota may have been exposed to a trematode but were incompatible from an immune perspective, potentially triggering an immune response that led to a temporary dysbiosis. Lastly, considering that we analyzed whole snail microbiota, we potentially sequenced the microbiota of the *B. truncatus* snail and its potential

infecting parasites so we could find different microbial signatures depending on the infecting trematode species as observed by Salloum and collaborators in the mud snail *Zeacumantus subacarinatus* infected by four different trematode species (Salloum *et al.* 2023). However, due to the low observed prevalence of infection in our study, we might have insufficient results to robustly explore the link between the infection status and the microbiota composition of *B. truncatus* which means that we may have missed such signals.

5. Conclusions

Our study highlights a well-structured geographical pattern in the microbiota of natural populations of *B. truncatus* that is best explained by the genetic structure of *B. truncatus* populations. This suggests an important role of the evolutionary trajectory of *B. truncatus* populations in shaping their microbiota. This calls for further studies to identify the potentially genomic determinants that influence the composition of hosts microbiota. Importantly however, some strong differences in the composition of *B. truncatus* microbiota from genetically and geographically close populations remain unexplained and suggest that some unexplored ecological factors or hosts' physiological traits (e.g. age or fitness) could also influence the microbiota of this species. Among these ecological factors we found that neither the bacterial communities from the surrounding aquatic environment nor the presence of trematode developing within hosts influence the overall structure of hosts microbiota. The temporal monitoring of the microbiota associated with hosts populations and that of the environment in which the hosts are established could provide a valuable approach to identify potential environmental factors at play in shaping host microbiota. In the case of *B. truncatus*, populations from habitats with high temporal environmental fluctuations such as temporary ponds should be targeted. More generally, such temporal monitoring studies in more temperate regions with important seasonal environmental changes would help better understanding the potential environmental factors influencing the microbiota of freshwater gastropods. Finally, further research on the interactions between genetic and environmental variables would be necessary to specifically assess the plasticity of hosts microbiota hence contributing to a better understanding of the relationship between the environment, hosts and their microbiota at the intra-specific level.

6. Acknowledgements

We warmly thank the Bio-Environment platform (UPVD, Région Occitanie, CPER 2007-2013 Technoviv, CPER 2015-2020 Technoviv2) and Jean-François Allienne, Margot Doberva and

Michèle Laudié for support in library preparation and sequencing. Microsatellites development and genotyping were performed at the PGTB (doi:10.15454/1.5572396583599417E12) with the help of Zoé Compagnie, Adline Delcamp and Erwan Guichoux. This study was supported in part by the European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP2) program (TMA2018CDF-2370), supported by the European Union. It was funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (PNRES 2019/1/059 Molrisk) and the Occitanie Region (Schistodiag program). This study was carried out with the support of LabEx CeMEB, an ANR 'Investissements d'avenir' program (ANR-10- LABX-04-01), and within the framework of the 'Laboratoire d'Excellence (LABEX)' TULIP (ANR-10LABX-41). It was also supported by the MICROVECT Project (défi clé RIVOC Occitanie Region, University of Montpellier).

7. References

- Abe EM, Guo Y-H, Shen H, et al. 2018. Phylogeography of *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) (Gastropoda: Planorbidae) in Selected African Countries. *Trop Med Infect Dis* 3: 127.
- Afelt A, Frutos R, and Devaux C. 2018. Bats, Coronaviruses, and Deforestation: Toward the Emergence of Novel Infectious Diseases? *Front Microbiol* 9.
- Alba A, Vazquez AA, and Hurtrez-Boussès S. 2021. Towards the comprehension of fasciolosis (re-)emergence: an integrative overview. *Parasitology* 148: 385–407.
- Almire F, Terhzaz S, Terry S, et al. 2021. Sugar feeding protects against arboviral infection by enhancing gut immunity in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 17: e1009870.
- Alonso-Pernas P, Bartram S, Arias-Cordero EM, et al. 2017. In Vivo Isotopic Labeling of Symbiotic Bacteria Involved in Cellulose Degradation and Nitrogen Recycling within the Gut of the Forest Cockchafer (*Melolontha hippocastani*). *Front Microbiol* 8.
- Alout H, Djègbè I, Chandre F, et al. 2014. Insecticide exposure impacts vector–parasite interactions in insecticide-resistant malaria vectors. *Proc R Soc B Biol Sci* 281: 20140389.
- Appleton CC. 1978. Review of Literature on Abiotic Factors Influencing the Distribution and Life Cycles of Bilharziosis Intermediate Host Snails. *Malacol Rev*.
- Archie EA and Tung J. 2015. Social behavior and the microbiome. *Curr Opin Behav Sci* 6: 28–34.
- Austin B. 2017. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110: 1247–56.

Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, et al. 2022. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol* 20: 193–205.

Bakker JD. 2024. *Applied Multivariate Statistics in R*.

Barreaux AMG, Barreaux P, Thievent K, and Koella JC. 2016. Larval environment influences vector competence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *MalariaWorld J* 7: 8.

Barredo E and DeGennaro M. 2020. Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. *Trends Parasitol* 36: 473–84.

Barzon L. 2018. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol* 107: 38–47.

Bassene H, Niang EHA, Fenollar F, et al. 2020. Role of plants in the transmission of *Asaia* sp., which potentially inhibit the *Plasmodium* sporogonic cycle in *Anopheles* mosquitoes. *Sci Rep* 10: 7144.

Becker JM, Ganatra AA, Kandie F, et al. 2020. Pesticide pollution in freshwater paves the way for schistosomiasis transmission. *Sci Rep* 10: 3650.

Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, et al. 2018. *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis* 65: 199–216.

Belfaiza M, Abrous M, Rondelaud D, et al. 2004. The use of *Tetraphyll* as food for snails increases the intensity of cercarial shedding in *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* 94: 86–90.

Belkaid Y and Harrison OJ. 2017. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity* 46: 562–76.

Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci* 107: 18933–8.

Berg M, Zhou XY, and Shapira M. 2016. Host-Specific Functional Significance of *Caenorhabditis* Gut Commensals. *Front Microbiol* 7: 1622.

Bernardo-Cravo AP, Schmeller DS, Chatzinotas A, et al. 2020. Environmental Factors and Host Microbiomes Shape Host–Pathogen Dynamics. *Trends Parasitol* 36: 616–33.

Besnard M, Lastère S, Teissier A, et al. 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* 19: 20751.

Bogale HN, Cannon MV, Keita K, et al. 2020. Relative contributions of various endogenous and exogenous factors to the mosquito microbiota. *Parasit Vectors* 13: 619.

- Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, et al. 2012. Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. *PLoS Pathog* 8: e1002742.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 10: 57–9.
- Bosio CF, Beaty BJ, and Black WC. 1998. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 59: 965–70.
- Brady C, Cleenwerck I, Venter S, et al. 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst Appl Microbiol* 36: 309–19.
- Bray JR and Curtis JT. 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 27: 326–49.
- Brown DS. 2014. *Freshwater Snails Of Africa And Their Medical Importance*. London: CRC Press.
- Bush A, Lafferty K, Lotz J, and Shostak A. 1997. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *J Parasitol* 83: 575–83.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13: 581–3.
- Caminade C, Medlock JM, Ducheyne E, et al. 2012. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *J R Soc Interface* 9: 2708–17.
- Caminade C, Van Dijk J, Baylis M, and Williams D. 2015. Modelling recent and future climatic suitability for fasciolosis in Europe. *Geospatial Health* 9: 301.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6: 1621–4.

- Caron Y, Rondelaud D, and Losson B. 2008. The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitol Res* 103: 735–44.
- Carpentier C, Dahlhaus A, Giesen N van de, and Maršálek B. 2013. The influence of hard substratum reflection and calibration profiles on in situ fluorescence measurements of benthic microalgal biomass. *Environ Sci Process Impacts* 15: 783–93.
- Carrington LB, Tran BCN, Le NTH, et al. 2018. Field- and clinically derived estimates of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus transmission potential in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 361–6.
- Carvajal-Lago L, Ruiz-López MJ, Figuerola J, and Martínez-de La Puente J. 2021. Implications of diet on mosquito life history traits and pathogen transmission. *Environ Res* 195: 110893.
- Catherine A, Escoffier N, Belhocine A, et al. 2012. On the use of the FluoroProbe®, a phytoplankton quantification method based on fluorescence excitation spectra for large-scale surveys of lakes and reservoirs. *Water Res* 46: 1771–84.
- Chabanol E, Behrends V, Prévot G, et al. 2020. Antibiotic Treatment in *Anopheles coluzzii* Affects Carbon and Nitrogen Metabolism. *Pathogens* 9: 679.
- Chang C-S and Kao C-Y. 2019. Current understanding of the gut microbiota shaping mechanisms. *J Biomed Sci* 26: 59.
- Chernin E. 1960. Infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni* under bacteriologically sterile conditions. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* 105: 292–6.
- Chevalier C, Stojanović O, Colin DJ, et al. 2015. Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell* 163: 1360–74.
- Chipev NH. 1993. Decoy effect and host infection by miracidia within snail communities. *Parasitology* 106: 265–76.
- Chitsulo L, Engels D, Montresor A, and Savioli L. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 77: 41–51.
- Christiansen-Jucht C, Parham PE, Saddler A, et al. 2014. Temperature during larval development and adult maintenance influences the survival of *Anopheles gambiae* s.s. *Parasit Vectors* 7: 489.
- Chu KY and Dawood IK. 1970. Cercarial Production from *Biomphalaria alexandrina* Infected with *Schistosoma mansoni*. *Bull World Health Organ* 42: 569–74.

- Civitello DJ, Fatima H, Johnson LR, et al. 2018. Bioenergetic theory predicts infection dynamics of human schistosomes in intermediate host snails across ecological gradients. *Ecol Lett* 21: 692–701.
- Clark DR, Underwood GJC, McGenity TJ, and Dumbrell AJ. 2021. What drives study-dependent differences in distance–decay relationships of microbial communities? *Glob Ecol Biogeogr* 30: 811–25.
- Coffey LL, Failloux A-B, and Weaver SC. 2014. Chikungunya Virus–Vector Interactions. *Viruses* 6: 4628–63.
- Collantes F, Delgado JA, Alarcón-Elbal PM, et al. 2014. First confirmed outdoor winter reproductive activity of Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Europe. *An Biol*.
- Collen B, Whitton F, Dyer EE, et al. 2014. Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. *Glob Ecol Biogeogr* 23: 40–51.
- Coon KL, Brown MR, and Strand MR. 2016. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Mol Ecol* 25: 5806–26.
- Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, and Strand MR. 2014. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol* 23: 2727–39.
- Correa AC, Escobar JS, Durand P, et al. 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evol Biol* 10: 381.
- Daisley BA, Chmiel JA, Pitek AP, et al. 2020. Missing Microbes in Bees: How Systematic Depletion of Key Symbionts Erodes Immunity. *Trends Microbiol* 28: 1010–21.
- Dalesman S and Lukowiak K. 2010. Effect of acute exposure to low environmental calcium on respiration and locomotion in *Lymnaea stagnalis* (L.). *J Exp Biol* 213: 1471–6.
- Dalesman S and Lukowiak K. 2012. How Stress Alters Memory in ‘Smart’ Snails. *PLOS ONE* 7: e32334.
- Dapa T, Wong DPGH, Vasquez KS, et al. 2023. Within-host evolution of the gut microbiome. *Curr Opin Microbiol* 71: 102258.
- David MR, Santos LMB dos, Vicente ACP, and Maciel-de-Freitas R. 2016. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111: 577–87.

- Davidson GL, Cienfuegos IA, and Dalesman S. 2024. Antibiotic-altered gut microbiota explain host memory plasticity and disrupt pace-of-life covariation for an aquatic snail. *ISME J* 18: wræ078.
- Del Lesto I, De Liberato C, Casini R, et al. 2022. Is Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) going to become homodynamic in Southern Europe in the next decades due to climate change? *R Soc Open Sci* 9: 220967.
- Dennison NJ, Saraiva RG, Cirimotich CM, et al. 2016. Functional genomic analyses of *Enterobacter*, *Anopheles* and *Plasmodium* reciprocal interactions that impact vector competence. *Malar J* 15: 425.
- Deure T van der, Maes T, Huyse T, and Stensgaard A-S. 2024. Climate change could fuel urinary schistosomiasis transmission in Africa and Europe. *Glob Change Biol* 30: e17434.
- Díaz-Sánchez S, Hernández-Jarguín A, Torina A, et al. 2018. Biotic and abiotic factors shape the microbiota of wild-caught populations of the arbovirus vector *Culicoides imicola*. *Insect Mol Biol* 27: 847–61.
- Dickson LB, Jiolle D, Minard G, et al. 2017. Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector. *Sci Adv* 3: e1700585.
- Douchet P, Boissier J, Mulero S, et al. 2022. Make visible the invisible: Optimized development of an environmental DNA metabarcoding tool for the characterization of trematode parasitic communities. *Environ DNA* 4: 627–41.
- Douchet P, Gourbal B, Loker ES, and Rey O. 2023. *Schistosoma* transmission: scaling-up competence from hosts to ecosystems. *Trends Parasitol* 39: 563–74.
- Douchet P, Haegeman B, Allienne J-F, et al. 2024. Snail hosts abundance mediates the effects of antagonist interactions between trematodes on the transmission of human schistosomes.
- Dreyfuss G, Abrous M, Vignoles P, and Rondelaud D. 2004. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: vertical distribution of metacercariae on plants under natural conditions. *Parasitol Res* 94: 70–3.
- Duan D-Y, Zhou H-M, and Cheng T-Y. 2020. Comparative analysis of microbial community in the whole body and midgut from fully engorged and unfed female adult *Melophagus ovinus*. *Med Vet Entomol* 34: 215–24.
- Ducklow HW, Boyle PJ, Mangel PW, et al. 1979. Bacterial flora of the schistosome vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Appl Environ Microbiol* 38: 667–72.

- Ducklow HW, Clausen K, and Mitchell R. 1981. Ecology of Bacterial Communities in the Schistosomiasis Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *Microb Ecol* 7: 253–74.
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, et al. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev Camb Philos Soc* 81: 163–82.
- Dunn OJ. 1964. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 6: 241–52.
- Ebrahimi B, Jackson BT, Guseman JL, et al. 2018. Alteration of plant species assemblages can decrease the transmission potential of malaria mosquitoes. *J Appl Ecol* 55: 841–51.
- Emery O, Schmidt K, and Engel P. 2017. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Mol Ecol* 26: 2576–90.
- Ezeakacha NF and Yee DA. 2019. The role of temperature in affecting carry-over effects and larval competition in the globally invasive mosquito *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors* 12: 123.
- Failloux A-B, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, and Rhodain F. 1999. Contrôle génétique de la compétence vectorielle des moustiques du genre *Aedes*.
- Fallet M, Montagnani C, Petton B, et al. 2022. Early life microbial exposures shape the *Crassostrea gigas* immune system for lifelong and intergenerational disease protection. *Microbiome* 10: 85.
- Farghaly A, Saleh AA, Mahdy S, et al. 2016. Molecular approach for detecting early prepatent *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria alexandrina* snail host. *J Parasit Dis Off Organ Indian Soc Parasitol* 40: 805–12.
- Farikou O, Njiokou F, Mbida Mbida JA, et al. 2010. Tripartite interactions between tsetse flies, *Sodalis glossinidius* and trypanosomes—An epidemiological approach in two historical human African trypanosomiasis foci in Cameroon. *Infect Genet Evol* 10: 115–21.
- Ferguson HM and Read AF. 2002. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc R Soc B Biol Sci* 269: 1217.
- Fikrig K, Peck S, Deckerman P, et al. 2020. Sugar feeding patterns of New York *Aedes albopictus* mosquitoes are affected by saturation deficit, flowers, and host seeking. *PLoS Negl Trop Dis* 14: e0008244.
- Flores HA, Taneja De Bruyne J, O'Donnell TB, et al. 2020. Multiple *Wolbachia* strains provide comparative levels of protection against dengue virus infection in *Aedes aegypti*. *PLOS Pathog* 16: e1008433.

- Foster W a. 2022. Chapter 7: Behavioural ecology of plant-mosquito relations. Sensory ecology of disease vectors. Wageningen Academic Publishers.
- Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, et al. 2011. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 17: 880–2.
- Fraune S, Forêt S, and Reitzel AM. 2016. Using *Nematostella vectensis* to Study the Interactions between Genome, Epigenome, and Bacteria in a Changing Environment. *Front Mar Sci* 3.
- Fukuda TTH, Pereira CF, Melo WGP, et al. 2021. Insights Into the Ecological Role of *Pseudomonas* spp. in an Ant-plant Symbiosis. *Front Microbiol* 12: 621274.
- Funkhouser LJ and Bordenstein SR. 2013. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLoS Biol* 11: e1001631.
- Furman O, Shenhav L, Sasson G, et al. 2020. Stochasticity constrained by deterministic effects of diet and age drive rumen microbiome assembly dynamics. *Nat Commun* 11: 1904.
- Galinier R, Roger E, Moné Y, et al. 2017. A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005398.
- Gall CA, Reif KE, Scoles GA, et al. 2016. The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. *ISME J* 10: 1846–55.
- Gao H, Cui C, Wang L, et al. 2019. Mosquito Microbiota and Implications for Disease Control. *Trends Parasitol* 36: 98.
- Gardner CL and Ryman KD. 2010. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med* 30: 237–60.
- Gary RE Jr and Foster WA. 2001. Effects of Available Sugar on the Reproductive Fitness and Vectorial Capacity of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 38: 22–8.
- Gendron EMS, Darcy JL, Hell K, and Schmidt SK. 2019. Structure of bacterial and eukaryote communities reflect in situ controls on community assembly in a high-alpine lake. *J Microbiol* 57: 852–64.
- Gilbert MTP, Rambaut A, Wlasiuk G, et al. 2007. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci* 104: 18566–70.
- Glöer P. 2019. The Freshwater Gastropods of the West-Palaearctis.

- Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, and Egozcue JJ. 2017. Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front Microbiol* 8.
- Goslee SC and Urban DL. 2007. The ecodist Package for Dissimilarity-based Analysis of Ecological Data. *J Stat Softw* 22: 1–19.
- Gould EA, Gallian P, Lamballerie X de, and Charrel RN. 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* 16: 1702–4.
- Grandadam M, Caro V, Plumet S, et al. 2011. Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerg Infect Dis* 17: 910–3.
- Green J and Bohannan BJM. 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends Ecol Evol* 21: 501–7.
- Grigaltchik VS, Webb C, and Seebacher F. 2016. Temperature modulates the effects of predation and competition on mosquito larvae. *Ecol Entomol* 41: 668–75.
- Gu W, Müller G, Schlein Y, et al. 2011. Natural Plant Sugar Sources of Anopheles Mosquitoes Strongly Impact Malaria Transmission Potential. *PLOS ONE* 6: e15996.
- Guégan M, Tran Van V, Martin E, et al. 2020. Who is eating fructose within the *Aedes albopictus* gut microbiota? *Environ Microbiol* 22: 1193–206.
- Guégan M, Zouache K, Démichel C, et al. 2018. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* 6: 49.
- Gupta KK, Prejneshu M, Aggarwal M, et al. 2021. A strategy to decrease vectorial competence of dengue mosquito *Aedes aegypti* by alteration of its gut microbiota using Indian traditional medicinal plants. *Int J Trop Insect Sci* 41: 2947–56.
- Halstead NT, Hoover CM, Arakala A, et al. 2018. Agrochemicals increase risk of human schistosomiasis by supporting higher densities of intermediate hosts. *Nat Commun* 9: 837.
- Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, and Reeves WC. 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol* 28: 229–62.
- Hardy OJ and Vekemans X. 2002. spag e d i: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2: 618–20.
- Hayashi I, Fujita H, and Toju H. 2024. Deterministic and stochastic processes generating alternative states of microbiomes. *ISME Commun* 4: ycae007.

Henry LP, Bruijning M, Forsberg SKG, and Ayroles JF. 2021. The microbiome extends host evolutionary potential. *Nat Commun* 12: 5141.

Herlemann DPR, Tammert H, Kivistik C, et al. 2024a. Distinct biogeographical patterns in snail gastrointestinal tract bacterial communities compared with sediment and water. *MicrobiologyOpen* 13: e13.

Herlemann DPR, Tammert H, Kivistik C, et al. 2024b. Distinct biogeographical patterns in snail gastrointestinal tract bacterial communities compared with sediment and water. *MicrobiologyOpen* 13: e13.

Hien DFDS, Dabiré KR, Roche B, et al. 2016. Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria. *PLoS Pathog* 12: e1005773.

Horton AA, Newbold LK, Palacio-Cortés AM, et al. 2020. Accumulation of polybrominated diphenyl ethers and microbiome response in the great pond snail *Lymnaea stagnalis* with exposure to nylon (polyamide) microplastics. *Ecotoxicol Environ Saf* 188: 109882.

Huot C, Clerissi C, Gourbal B, et al. 2020. Schistosomiasis Vector Snails and Their Microbiota Display a Phylosymbiosis Pattern. *Front Microbiol* 10: 3092.

Hurtrez-Boussès S, Meunier C, Durand P, and Renaud F. 2001. Dynamics of host–parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes Infect* 3: 841–9.

Jaccard P. 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. *Bull Société Vaudoise Sci Nat* 37: 547.

Jarne P, Viard F, Delay B, and Cuny G. 1994. Variable microsatellites in the highly selfing snail *Bulinus truncatus* (Basommatophora: Planorbidae). *Mol Ecol* 3: 527–8.

Johnson SG, Lively CM, and Schrag SJ. 1997. Evolution and ecological correlates of uniparental and biparental reproduction in freshwater snails. In: Streit B, Städler T, Lively CM (Eds). *Evolutionary Ecology of Freshwater Animals: Concepts and Case Studies*. Basel: Birkhäuser.

Jombart T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403–5.

Kahlert M and McKie BG. 2014. Comparing new and conventional methods to estimate benthic algal biomass and composition in freshwaters. *Environ Sci Process Impacts* 16: 2627–34.

Kariuki HC, Clennon JA, Brady MS, et al. 2004. Distribution patterns and cercarial shedding of *Bulinus nasutus* and other snails in the Msambweni area, Coast Province, Kenya.

- Kaylor MJ, Argerich A, White SM, et al. 2018. A cautionary tale for in situ fluorometric measurement of stream chlorophyll a: influences of light and periphyton biomass. *Freshw Sci* 37: 287–95.
- Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, et al. 2016. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol* 32: 458–69.
- Kennedy SR, Tsau S, Gillespie R, and Krehenwinkel H. 2020. Are you what you eat? A highly transient and prey-influenced gut microbiome in the grey house spider *Badumna longinqua*. *Mol Ecol* 29: 1001–15.
- Khan ST, Horiba Y, Yamamoto M, and Hiraishi A. 2002. Members of the Family Comamonadaceae as Primary Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate)-Degrading Denitrifiers in Activated Sludge as Revealed by a Polyphasic Approach. *Appl Environ Microbiol* 68: 3206–14.
- Kivistik C, Tammert H, Kisand V, et al. 2023. Impact of disturbance and dietary shift on gastrointestinal bacterial community and its invertebrate host system. *Mol Ecol* 32: 6631–43.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41: e1.
- Kohl KD. 2020. Ecological and evolutionary mechanisms underlying patterns of phyllosymbiosis in host-associated microbial communities. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 375: 20190251.
- Kumar G, Eble JE, and Gaither MR. 2020. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. *Mol Ecol Resour* 20: 29–39.
- Lahti L and Shetty S. 2012. microbiome R package.
- Lai PF and Canning EU. 1980. Infectivity of a microsporidium of mosquitoes (*Nosema algerae*) to larval stages of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Int J Parasitol* 10: 293–301.
- Lambrechts L, Chavatte J-M, Snounou G, and Koella JC. 2006. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc R Soc B Biol Sci* 273: 1501.
- Lange C, Boyer S, Bezemer TM, et al. 2023. Impact of intraspecific variation in insect microbiomes on host phenotype and evolution. *ISME J* 17: 1798–807.
- Laverdeur J, Desmecht D, Hayette M-P, and Darcis G. 2024. Dengue and chikungunya: future threats for Northern Europe? *Front Epidemiol* 4: 1342723.

- Le Clec'h W, Nordmeyer S, Anderson TJC, and Chevalier FD. 2022. Snails, microbiomes, and schistosomes: a three-way interaction? *Trends Parasitol* 38: 353–5.
- Lefevre T, Ohm J, Dabiré KR, et al. 2018. Transmission traits of malaria parasites within the mosquito: Genetic variation, phenotypic plasticity, and consequences for control. *Evol Appl* 11: 456–69.
- Lefèvre T, Oliver L, Hunter MD, and De Roode JC. 2010. Evidence for trans-generational medication in nature. *Ecol Lett* 13: 1485–93.
- Lefèvre T, Sauvion N, Almeida RPP, et al. 2022. The ecological significance of arthropod vectors of plant, animal, and human pathogens. *Trends Parasitol* 38: 404–18.
- Lefèvre T, Vantoux A, Dabiré KR, et al. 2013. Non-Genetic Determinants of Mosquito Competence for Malaria Parasites. *PLoS Pathog* 9: e1003365.
- Levi JE. 2016. Dengue Virus and Blood Transfusion. *J Infect Dis* 213: 689–90.
- Lewis J, Gallichotte EN, Randall J, et al. 2023. Intrinsic factors driving mosquito vector competence and viral evolution: a review. *Front Cell Infect Microbiol* 13.
- Liberti J and Engel P. 2020. The gut microbiota — brain axis of insects. *Curr Opin Insect Sci* 39: 6–13.
- Liddon J and Dalesman S. 2015. Trail following differs between wild and captive-reared snails, *Lymnaea stagnalis*. *J Molluscan Stud* 81: 299–302.
- Lim JH, Baek S-H, and Lee S-T. 2009. *Ferruginibacter alkalilentus* gen. nov., sp. nov. and *Ferruginibacter lapsinensis* sp. nov., novel members of the family 'Chitinophagaceae' in the phylum Bacteroidetes, isolated from freshwater sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2394–9.
- Lin D, Lacey EA, Bach BH, et al. 2020. Gut microbial diversity across a contact zone for California voles: Implications for lineage divergence of hosts and mitonuclear mismatch in the assembly of the mammalian gut microbiome. *Mol Ecol* 29: 1873–89.
- Linenberg I, Christophides GK, and Gendrin M. 2016. Larval diet affects mosquito development and permissiveness to *Plasmodium* infection. *Sci Rep* 6: 38230.
- Liu Y, Shen Z, Yu J, et al. 2020. Comparison of gut bacterial communities and their associations with host diets in four fruit borers. *Pest Manag Sci* 76: 1353–62.
- Louradour I, Monteiro CC, Inbar E, et al. 2017. The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. *Cell Microbiol* 19: e12755.

- Lukowiak K, Orr M, Caigny P de, et al. 2010. Ecologically relevant stressors modify long-term memory formation in a model system. *Behav Brain Res* 214: 18–24.
- Luo J, Cheng Y, Guo L, et al. 2021. Variation of gut microbiota caused by an imbalance diet is detrimental to bugs' survival. *Sci Total Environ* 771: 144880.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, et al. 2015. *Arachidicoccus rhizosphaerae* gen. nov., sp. nov., a plant-growth-promoting bacterium in the family Chitinophagaceae isolated from rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 578–86.
- Madsen H. 1992. Food selection by freshwater snails in the Gezira irrigation canals, Sudan. *Hydrobiologia* 228: 203–17.
- Maes T, De Corte Z, Vangestel C, et al. 2022. Large-scale and small-scale population genetic structure of the medically important gastropod species *Bulinus truncatus* (Gastropoda, Heterobranchia). *Parasit Vectors* 15: 328.
- Mandahl-Barth G. 1962. Key to the identification of East and Central African freshwater snails of medical and veterinary importance. *Bull World Health Organ* 27: 135–50.
- Manea L and Alexandrescu DC. 2013. STUDIES ON THE CONTENT OF METALS AND PESTICIDES IN FRUIT GROWING AREAS AND THEIR ECOTOXICOLOGICAL IMPACT. *Rev Roum Chim*.
- Marchesi JR and Ravel J. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3: 31.
- Martin LB, Burgan SC, Adelman JS, and Gervasi SS. 2016. Host Competence: An Organismal Trait to Integrate Immunology and Epidemiology. *Integr Comp Biol* 56: 1225–37.
- Martínez-Ortí A, Bargues MD, and Mas-Coma S. 2015. Dos nuevas localizaciones para España de *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) (Gastropoda: Planorbidae), hospedador intermediario de Schistosomiasis urinaria. *Arx Miscel·lània Zoològica* 13: 25–31.
- Mazel F, Davis KM, Loudon A, et al. 2018. Is Host Filtering the Main Driver of Phyllosymbiosis across the Tree of Life? *mSystems* 3: 10.1128/msystems.00097-18.
- McCann P, McFarland C, Megaw J, et al. 2024. Assessing the microbiota of the snail intermediate host of trematodes, *Galba truncatula*. *Parasit Vectors* 17: 31.
- McMurdie PJ and Holmes S. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8: e61217.

- Medini D, Serruto D, Parkhill J, et al. 2008. Microbiology in the post-genomic era. *Nat Rev Microbiol* 6: 419–30.
- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, et al. 2012. A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 12: 435–47.
- Merrill TES and Johnson PTJ. 2020. Towards a mechanistic understanding of competence: a missing link in diversity–disease research. *Parasitology* 147: 1159–70.
- Mikhailov IS, Zakharova YR, Bukin YS, et al. 2019. Co-occurrence Networks Among Bacteria and Microbial Eukaryotes of Lake Baikal During a Spring Phytoplankton Bloom. *Microb Ecol* 77: 96–109.
- Minard G, Tikhonov G, Ovaskainen O, and Saastamoinen M. 2019. The microbiome of the *Melitaea cinxia* butterfly shows marked variation but is only little explained by the traits of the butterfly or its host plant. *Environ Microbiol* 21: 4253–69.
- Minard G, Tran FH, Raharimalala FN, et al. 2013. Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Cinetobacter* and *Saia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol* 83: 63–73.
- Minard G, Tran F-H, Van VT, et al. 2018. Shared larval rearing environment, sex, female size and genetic diversity shape *Ae. albopictus* bacterial microbiota. *PLOS ONE* 13: e0194521.
- Mitta G, Adema CM, Gourbal B, et al. 2012. Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. *Dev Comp Immunol* 37: 1–8.
- Mizushima D, Yamamoto DS, Tabbabi A, et al. 2023. A rare sugar, allose, inhibits the development of *Plasmodium* parasites in the *Anopheles* mosquito independently of midgut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 13.
- Moazeni M and Ahmadi A. 2016. Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* 169: 81–9.
- Moller-Jacobs LL, Murdock CC, and Thomas MB. 2014. Capacity of mosquitoes to transmit malaria depends on larval environment. *Parasit Vectors* 7: 593.
- Montagna M, Mereghetti V, Gargari G, et al. 2016. Evidence of a bacterial core in the stored products pest *Plodia interpunctella*: the influence of different diets. *Environ Microbiol* 18: 4961–73.

- Mouahid A and Mone H. 1990. Interference of *Echinoparyphium elegans* with the host-parasite system *Bulinus truncatus*—*Schistosoma bovis* in natural conditions. *Ann Trop Med Parasitol* 84: 341–8.
- Mukherjee D, Das S, Begum F, et al. 2019. The Mosquito Immune System and the Life of Dengue Virus: What We Know and Do Not Know. *Pathogens* 8: 77.
- Munster M van. 2020. Impact of Abiotic Stresses on Plant Virus Transmission by Aphids. *Viruses* 12: 216.
- Murdock CC, Paaijmans KP, Bell AS, et al. 2012. Complex effects of temperature on mosquito immune function. *Proc R Soc B Biol Sci* 279: 3357–66.
- Murrieta RA, Garcia-Luna SM, Murrieta DJ, et al. 2021. Impact of extrinsic incubation temperature on natural selection during Zika virus infection of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *PLOS Pathog* 17: e1009433.
- Muturi EJ and Alto BW. 2011. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 1157–63.
- Muturi EJ, Blackshear Jr. M, and Montgomery A. 2012. Temperature and density-dependent effects of larval environment on *Aedes aegypti* competence for an alphavirus. *J Vector Ecol* 37: 154–61.
- Muturi EJ, Lagos-Kutz D, Dunlap C, et al. 2018. Mosquito microbiota cluster by host sampling location. *Parasit Vectors* 11: 468.
- Nasir P and Erasmus DA. 1964. A Key to the Cercariae from British Freshwater Molluscs. *J Helminthol* 38: 245.
- Nei M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics* 89: 583–90.
- Neu AT, Allen EE, and Roy K. 2021. Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proc Natl Acad Sci* 118: e2104429118.
- Njiokou F, Bellec C, Berrebi P, et al. 1993. Do self-fertilization and genetic drift promote a very low genetic variability in the allotetraploid *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae) populations? *Genet Res* 62: 89–100.
- Noden BH, Vaughan JA, Pumpuni CB, and Beier JC. 2011. Mosquito ingestion of antibodies against mosquito midgut microbiota improves conversion of ookinetes to oocysts for *Plasmodium falciparum*, but not *P. yoelii*. *Parasitol Int* 60: 440–6.

- Noël H, Ruello M, Maccary A, et al. 2018. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect* 24: 295–300.
- Nunes RD, Ventura-Martins G, Moretti DM, et al. 2016. Polyphenol-Rich Diets Exacerbate AMPK-Mediated Autophagy, Decreasing Proliferation of Mosquito Midgut Microbiota, and Extending Vector Lifespan. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0005034.
- Nwoko OE, Mogaka JJO, and Chimbari MJ. 2021. Challenges and Opportunities Presented by Current Techniques for Detecting Schistosome Infections in Intermediate Host Snails: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health* 18: 5403.
- Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, et al. 2022. *vegan: Community Ecology Package*.
- Oliveira S, Capinha C, and Rocha J. 2023. Predicting the time of arrival of the Tiger mosquito (*Aedes albopictus*) to new countries based on trade patterns of tyres and plants. *J Appl Ecol* 60: 2362–74.
- Oliveira ALD, Da Silva D, Zanotti-Magalhaes EM, et al. 2008. Schistosome/mollusk: genetic compatibility. *Genet Mol Res* 7: 518–26.
- Orr MV, El-Bekai M, Lui M, et al. 2007. Predator detection in *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol* 210: 4150–8.
- Parales RE and Harwood CS. 1993. Regulation of the *pcaIJ* genes for aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 175: 5829–38.
- Paré PSL, Hien DFDS, Bayili K, et al. 2022. Natural plant diet impacts phenotypic expression of pyrethroid resistance in *Anopheles* mosquitoes. *Sci Rep* 12: 21431.
- Paré PSL, Hien DFDS, Youba M, et al. 2024. The paradox of plant preference: The malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* select suboptimal food sources for their survival and reproduction. *Ecol Evol* 14: e11187.
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, et al. 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11: 1177–85.
- Phalnikar K, Kunte K, and Agashe D. 2018. Dietary and developmental shifts in butterfly-associated bacterial communities. *R Soc Open Sci* 5: 171559.
- Pialoux G, Gaüzère B-A, Jauréguiberry S, and Strobel M. 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7: 319–27.

Portet A, Toulza E, Lokmer A, et al. 2021. Experimental Infection of the *Biomphalaria glabrata* Vector Snail by *Schistosoma mansoni* Parasites Drives Snail Microbiota Dysbiosis. *Microorganisms* 9: 1084.

Priyadarsini SL, Suresh M, and Huisinsh D. 2020. What can we learn from previous pandemics to reduce the frequency of emerging infectious diseases like COVID-19? *Glob Transit* 2: 202–20.

Przybylińska PA and Wyszowski M. 2016. Environmental contamination with phthalates and its impact on living organisms. *Ecol Chem Eng S* 23: 347–56.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: D590–6.

R Core Team. 2023. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ramirez JL, Souza-Neto J, Cosme RT, et al. 2012. Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1561.

Reese AT and Dunn RR. 2018. Drivers of Microbiome Biodiversity: A Review of General Rules, Feces, and Ignorance. *mBio* 9: e01294-18.

Regasa A and Seboka M. 2022. Review on Fasciolosis, its Effect on Meat Quality/Hazards and Economical Importance. 10: 247.

Reid AJ, Carlson AK, Creed IF, et al. 2019. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol Rev* 94: 849–73.

Richards SL, Lord CC, Pesko KN, and Tabachnick WJ. 2010. Environmental and Biological Factors Influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Vector Competence for West Nile Virus. *Am J Trop Med Hyg* 83: 126–34.

Richards SL, White AV, and Balanay JAG. 2017. Potential for sublethal insecticide exposure to impact vector competence of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for dengue and Zika viruses. *Res Rep Trop Med* 8: 53–7.

Risely A. 2020. Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *J Anim Ecol* 89: 1549–58.

Rodgers FH, Gendrin M, Wyer CAS, and Christophides GK. 2017. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLOS Pathog* 13: e1006391.

- Rojas M, Monsalve DM, Pacheco Y, et al. 2020. Ebola virus disease: An emerging and re-emerging viral threat. *J Autoimmun* 106: 102375.
- Roldán C, Begovoeva M, López-Olvera JR, et al. 2021. Endemic occurrence of *Fasciola hepatica* in an alpine ecosystem, Pyrenees, Northeastern Spain. *Transbound Emerg Dis* 68: 2589–94.
- Rollinson D, Stothard JR, and Southgate VR. 2001. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. *Parasitology* 123: 245–60.
- Rondelaud D, Denève C, Belfaiza M, et al. 2004. Variability in the prevalence of infection and cercarial production in *Galba truncatula* raised on a high-quality diet. *Parasitol Res* 92: 242–5.
- Rondelaud D, Hourdin P, Vignoles P, et al. 2011. The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. *Vet Parasitol* 181: 166–73.
- Rondelaud D, Sanabria R, Vignoles P, et al. 2013. *Fasciola hepatica*: variations in redial development and cercarial production in relation to the geographic origin of the parasite. *Parasite* 20: 33.
- Rothe C, Zimmer T, Schunk M, et al. Developing Endemicity of Schistosomiasis, Corsica, France - Volume 27, Number 1—January 2021 - *Emerging Infectious Diseases* journal - CDC.
- Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, et al. 2018. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555: 210–5.
- Ruche GL, Souarès Y, Armengaud A, et al. 2010. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance* 15: 19676.
- Rumschlag SL, Halstead NT, Hoverman JT, et al. 2019. Effects of pesticides on exposure and susceptibility to parasites can be generalised to pesticide class and type in aquatic communities. *Ecol Lett* 22: 962–72.
- Russell MC, Rappazzo KM, and Hoffman JC. 2023. Ecological Degradation and the Risk of Mosquito-Borne Disease in the Great Lakes Basin. *EcoHealth* 20: 150–5.
- Saati-Santamaría Z, Rivas R, Kolařík M, and García-Fraile P. 2021. A New Perspective of *Pseudomonas*—Host Interactions: Distribution and Potential Ecological Functions of the Genus *Pseudomonas* within the Bark Beetle Holobiont. *Biology* 10: 164.
- Sadeghi J, Chaganti SR, Shahraki AH, and Heath DD. 2021. Microbial community and abiotic effects on aquatic bacterial communities in north temperate lakes. *Sci Total Environ* 781: 146771.

Salgado JFM, Premkrishnan BNV, Oliveira EL, et al. 2024. The Interplay Between Nutrition and the Dynamics of the Midgut Microbiome of the Mosquito *Aedes aegypti* Reveals Putative Symbionts.

Salloum PM, Jorge F, and Poulin R. 2023. Different trematode parasites in the same snail host: Species-specific or shared microbiota? *Mol Ecol* 32: 5414–28.

Sarma DK, Kumar M, Dhurve J, et al. 2022. Influence of Host Blood Meal Source on Gut Microbiota of Wild Caught *Aedes aegypti*, a Dominant Arboviral Disease Vector. *Microorganisms* 10: 332.

Schmeller DS, Courchamp F, and Killeen G. 2020. Biodiversity loss, emerging pathogens and human health risks. *Biodivers Conserv* 29: 3095–102.

Schols R, Carolus H, Hammoud C, et al. 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* 113: 722–9.

Schols R, Mudavanhu A, Carolus H, et al. 2020. Exposing the Barcoding Void: An Integrative Approach to Study Snail-Borne Parasites in a One Health Context. *Front Vet Sci* 7.

Schols R, Vanoverberghe I, Huyse T, and Decaestecker E. 2023. Host-bacteriome transplants of the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata* reflect species-specific associations. *FEMS Microbiol Ecol* 99: fiad101.

Scolari F, Casiraghi M, and Bonizzoni M. 2019. *Aedes* spp. and Their Microbiota: A Review. *Front Microbiol* 10.

Šebesta O and Gelbič I. 2016. Late flooding combined with warm autumn — potential possibility for prolongation of transmission of mosquito-borne diseases. *Biologia (Bratisl)* 71: 1292–7.

Semenza JC and Paz S. 2021. Climate change and infectious disease in Europe: Impact, projection and adaptation. *Lancet Reg Health – Eur* 9.

Senghor B, Mathieu-Begn  E, Rey O, et al. 2022. Urogenital schistosomiasis in three different water access in the Senegal river basin: prevalence and monitoring praziquantel efficacy and re-infection levels. *BMC Infect Dis* 22: 968.

Shaji Mathew J, Menon VP, Menon VP, et al. 2019. Dengue virus transmission from live donor liver graft. *Am J Transplant* 19: 1838–46.

Shannon CE. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J*.

Shao Y, Arias-Cordero E, Guo H, et al. 2014. In Vivo Pyro-SIP Assessing Active Gut Microbiota of the Cotton Leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PLOS ONE* 9: e85948.

- Sharon G, Segal D, Ringo JM, et al. 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 107: 20051–6.
- Silva TM, Melo ES, Lopes ACS, et al. 2013. Characterization of the bacterial microbiota of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda) from Brazil. *Lett Appl Microbiol* 57: 19–25.
- Silva Pessoa Vieira CJ da, Steiner São Bernardo C, Ferreira da Silva DJ, et al. 2022. Land-use effects on mosquito biodiversity and potential arbovirus emergence in the Southern Amazon, Brazil. *Transbound Emerg Dis* 69: 1770–81.
- Simon V, Sampaio Silva X, Ramajo M, and Conceicao A. 1974. Susceptibility of *Bulinus truncatus* from Portugal and other origins to a strain of *Schistosoma bovis* of Salamanca (Spain). *Rev Iber Parasitol*.
- Simpson EH. 1949. Measurement of Diversity. *Nature* 163: 688–688.
- Singh AK, Kaur R, Verma S, and Singh S. 2022. Antimicrobials and Antibiotic Resistance Genes in Water Bodies: Pollution, Risk, and Control. *Front Environ Sci* 10.
- Sokolow SH, Jones IJ, Jocque M, et al. 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 B Biol Sci* 372: 20160127.
- Soliman MFM. 2008. Epidemiological review of human and animal fascioliasis in Egypt. *J Infect Dev Ctries* 2: 182–9.
- Sommer F, Ståhlman M, Ilkayeva O, et al. 2016. The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus arctos*. *Cell Rep* 14: 1655–61.
- Spernovasilis N, Tsiodras S, and Poulakou G. 2022. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: Humankind's Companions and Competitors. *Microorganisms* 10: 98.
- Stone CM, Jackson BT, and Foster WA. 2012. Effects of Plant-Community Composition on the Vectorial Capacity and Fitness of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Am J Trop Med Hyg* 87: 727–36.
- Strand MR. 2018. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. *Curr Opin Insect Sci* 28: 59–65.
- Suzuki TA, Phifer-Rixey M, Mack KL, et al. 2019. Host genetic determinants of the gut microbiota of wild mice. *Mol Ecol* 28: 3197–207.

- Suzzi AL, Stat M, Gaston TF, and Huggett MJ. 2023. Spatial patterns in host-associated and free-living bacterial communities across six temperate estuaries. *FEMS Microbiol Ecol* 99: fiad061.
- Teichmann D, Grobusch MP, Göbels K, et al. 2000. Acute Fascioliasis with Multiple Liver Abscesses. *Scand J Infect Dis* 32: 558–60.
- Tenywa FC, Musa JJ, Musiba RM, et al. 2024. Sugar and blood: the nutritional priorities of the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors* 17: 26.
- Toledo R and Fried B (Eds). 2014. *Digenetic Trematodes*. New York, NY: Springer New York.
- Trouve S, Degen L, and Goudet J. 2005. Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail *Galba truncatula*. *J Evol Biol* 18: 358–70.
- Tucker MS, Lewis FA, Driver JD, and Granath WO. 2014. Determination and Quantification of *Schistosoma mansoni* Cercarial Emergence from *Biomphalaria glabrata* Snails. *J Parasitol* 100: 778–83.
- Unlu I, Farajollahi A, Strickman D, and Fonseca DM. 2013. Crouching Tiger, Hidden Trouble: Urban Sources of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Refractory to Source-Reduction. *PLoS ONE* 8: e77999.
- Upshur IF, Fehlman M, Parikh V, et al. 2023. Sugar feeding by invasive mosquito species on ornamental and wild plants. *Sci Rep* 13: 22121.
- Van Handel E. 1967. Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. *Anal Biochem* 19: 193–4.
- Van Horn DJ, Garcia JR, Loker ES, et al. 2012. Complex intestinal bacterial communities in three species of planorbid snails. *J Molluscan Stud* 78: 74–80.
- Vandekerckhove O, De Buck E, and Van Wijngaerden E. 2021. Lyme disease in Western Europe: an emerging problem? A systematic review. *Acta Clin Belg* 76: 244–52.
- Vareille-Morel C, Dreyfuss G, and Rondelaud D. 1999. The characteristics of habitats colonized by three species of *Lymnaea* (Mollusca) in swampy meadows on acid soil : their interest for control of fasciolosis. *Ann Limnol - Int J Limnol* 35: 173–8.
- Vázquez AA, Sabourin E, Alda P, et al. 2021. Genetic diversity and relationships of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda) with native and introduced definitive and intermediate hosts. *Transbound Emerg Dis* 68: 2274–86.

- Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, et al. 2016. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet* 387: 228.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, and Cole JR. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261–7.
- Wang H, Liu C, Liu Z, et al. 2020. The different dietary sugars modulate the composition of the gut microbiota in honeybee during overwintering. *BMC Microbiol* 20: 61.
- Wilkman L, Ahlm C, Evander M, and Lwande OW. 2023. Mosquito-borne viruses causing human disease in Fennoscandia—Past, current, and future perspectives. *Front Med* 10.
- Wilson AJ, Morgan ER, Booth M, et al. 2017. What is a vector? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372: 20160085.
- Wiroonpan P, Chontanarith T, and Purivirojkul W. 2021. Cercarial trematodes in freshwater snails from Bangkok, Thailand: prevalence, morphological and molecular studies and human parasite perspective. *Parasitology* 148: 366–83.
- Wong AC-N, Dobson AJ, and Douglas AE. 2014. Gut microbiota dictates the metabolic response of *Drosophila* to diet. *J Exp Biol* 217: 1894–901.
- Wu VY, Chen B, Christofferson R, et al. 2022. A minimum data standard for vector competence experiments. *Sci Data* 9: 634.
- Wu X, Tian H, Zhou S, et al. 2014. Impact of global change on transmission of human infectious diseases. *Sci China Earth Sci* 57: 189–203.
- Wu Y, Zaiden N, and Cao B. 2018. The Core- and Pan-Genomic Analyses of the Genus *Comamonas*: From Environmental Adaptation to Potential Virulence. *Front Microbiol* 9: 3096.
- Yadav KK, Datta S, Naglot A, et al. 2016. Diversity of Cultivable Midgut Microbiota at Different Stages of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India. *PLOS ONE* 11: e0167409.
- Yamany AS and Abdel-Gaber R. 2024. Influence of adult body size on blood feeding behavior and eggs retention in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Microsc Res Tech* 87: 2321–35.
- Yan J, Kibech R, and Stone CM. 2021. Differential effects of larval and adult nutrition on female survival, fecundity, and size of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Front Zool* 18: 10.
- Yan J, Kim C-H, Chesser L, et al. 2023. Nutritional stress compromises mosquito fitness and antiviral immunity, while enhancing dengue virus infection susceptibility. *Commun Biol* 6: 1123.

Young ND, Stroehlein AJ, Wang T, et al. 2022. Nuclear genome of *Bulinus truncatus*, an intermediate host of the carcinogenic human blood fluke *Schistosoma haematobium*. *Nat Commun* 13: 977.

Yuan C, Xing L, Wang M, et al. 2021. Microbiota modulates gut immunity and promotes baculovirus infection in *Helicoverpa armigera*. *Insect Sci* 28: 1766–79.

Zouache K, Martin E, Rahola N, et al. 2022. Larval habitat determines the bacterial and fungal microbiota of the mosquito vector *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol Ecol* 98.

8. Data Accessibility and Benefit-Sharing

8.1. Data Accessibility Statement

All sequence data generated have been submitted to the Sequence Read Archive of NCBI.

8.2. Benefit-Sharing Statement

This project obtained from the Nagoya office in Senegal, an exemption from authorization of access and use of genetic resources (number: 001339 of November 15, 2021, reference: V/L du 28 octobre 2021) by the Competent National Authority (Directorate of National Parks of Senegal).

9. Authors Contributions

O.R., P.D., B.G., M.J. were responsible for the research design. O.R., P.D., B.S., J.B. conducted the field work. M.J. and P.D. conducted the lab work. O.L. and E.C. developed the microsatellite dataset. M.J., P.D., O.R., E.T., and T.L. contributed to the data analysis. M.J., O.R. and P.D. wrote the initial draft of the manuscript and all authors contributed to revisions. O.R. and B.G. supervised the project.

Supplemental Information for:

Evidences that host genetic background more than the environment shapes the microbiota of the snail *Bulinus truncatus*, an intermediate host of *Schistosoma* species.

Mathilde Jaquet ; Philippe Douchet ; Eve Toulza ; Thierry Lefevre ; Bruno Senghor ; Jérôme Boissier ; Olivier Lepais ; Emilie Chancerel ; Benjamin Gourbal ; Olivier Rey

Table of Contents:

Appendix number	Title	Page
1	Infection status of <i>B. truncatus</i> snails	2
2	Microsatellite development	2
3	Sequence-Based Microsatellite Genotyping	3

Fig number	Title	Page
Suppl. fig 1	Scatterplot displaying Nei's genetic distance between individuals as a function of the geographic distance across sampling sites.	7

Suppl. fig 2	Alpha diversity computed on the bacterial communities from the environmental water-sediment samples and isolated from <i>B. truncatus</i> snail hosts at each sampling site.	7
Suppl. fig 3	Alpha diversity computed on the bacterial communities isolated from <i>B. truncatus</i> snail hosts at each sampling site.	8
Suppl. fig 4	Relative abundance of Cyanobacteria and Plantomycetota phyla in environmental samples and <i>B. truncatus</i> snails among the different sampling sites.	9
Suppl. fig 5	Principal coordinate analysis (PCoA) plot showing environmental samples and <i>B. truncatus</i> snail associated bacterial communities distributed along the two first PCoA axes computed based on pairwise Bray-Curtis distance obtained between each sample.	9
Suppl. fig 6	Principal coordinate analysis (PCoA) plot showing the bacterial communities of <i>B. truncatus</i> snails according to their original sampling sites, and to their infectious status distributed along the two first PCoA axes based on pairwise Bray-Curtis distance computed between each sample.	10

Table number	Title	Page
Suppl. table 1	Abundance of <i>B. truncatus</i> , trematode prevalence among sites.	4
Suppl. table 5	Results of Kruskal-Wall test comparing the <i>B. truncatus</i> alpha-diversity depending on the sampling site.	8
Suppl. table 6	Results of Kruskal-Wall test comparing the <i>B. truncatus</i> alpha-diversity depending on the infectious status of individuals.	8
Suppl. table 7	Results of PERMANOVA analysis comparing the <i>B. truncatus</i> beta-diversity based on Bray-Curtis distance revealing significant differences depending on the sampling site but not on the infectious status of the hosts.	10

Appendix 1: Infection status of *B. truncatus* snails

The presence of developing trematodes within each of the 124 snails was diagnosed using the Trem_16S_F1 (GACGGAAAGACCCCRAGA) and Trem-16S_R2 (CRCCGGTYTTAACTCARYTCAT) 16S trematode metabarcode developed by (Douchet *et al.* 2022). DNA extract from each snail was first diluted to 1/100th to limit the potential effect of PCR inhibitors and hence limit PCR false negatives. PCRs were performed using the GoTaq® G2 Hot Start Polymerase kit (Promega). Each PCR reaction contained Green Buffer at 1X, MgCl₂ at 1.5mM, dNTPs at 0.2μM, forward and reverse primers at 0.4μM, 1.25 units of GoTaq G2 Hot Start, 2μL of 1/100 DNA (~ 1.5 ng) sample and ultrapure water in a final reaction volume of 10μL. The PCR program was as follows: an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, hybridization at 54°C for 30 sec and elongation at 72°C for 15 sec, and a final elongation step at

72°C for 5 min. A subset of 5 µL of the resulting PCR products were migrated on a 2% agarose gel for 30 min at 110V and revealed under UV. Positive samples were reamplified in a final volume of 25 µL using the same Trem_16S_F1 and Trem_16S_R2 primers implemented with Illumina sequencing adapters and clear Buffer.

Appendix 2: Microsatellite development

The *B. truncatus* genome (GenBank accession GCA_021962125.1, (Young *et al.* 2022)) was used for microsatellite discovery using the software QDD v3.1.2 (Megléc *et al.* 2010). Primer design parameters were set to target 100 pb to 180 pb amplicons and with primer parameters optimized for multiplex PCR (Lepais *et al.* 2020). A total of 96 primer pairs (9 tetranucleotide and 66 trinucleotide motifs with more than 6 repeats, and 21 dinucleotide motif with more than 16 repeats) were selected based on criteria maximizing amplification success (Megléc *et al.* 2014) and polymorphisms (i.e. high number of repeats). PrimerPooler software (Brown *et al.* 2017) was used to determine two sets of markers to co-amplify into two multiplex PCR (W1 and W2, suppl. Table 2). The primers were built by adding the universal sequence ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT to the 5' end of each forward primer and the universal sequence GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT-CT at the 5' end of each reverse primer.

Each pair of primers was tested for amplification on a DNA pool from a subset of *B. truncatus* specimens. The PCR was performed in a final volume of 10 µL using Hot Firepol Blend master mix (Solis Biodyne), 10 ng of DNA and 0.2 µM of each primer. The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 15 min followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 20 sec, annealing at 59°C for 60 sec, extension at 72°C for 30 sec, and a final extension step at 72°C for 10 min. Amplification was checked on a 3% agarose gel. Primer pairs that showed consistent amplification with amplicon at the expected size were kept for multiplex PCRs.

Appendix 3: Sequence-Based Microsatellite Genotyping

Each multiplex PCR amplification was performed in a final volume of 5 µL using 5X Hot Firepol Multiplex master mix (Solis Biodyne), 0.05 µM of each primer, and 10 ng of DNA. The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 12 min followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 59°C for 180 sec, extension at 72°C for 30 sec, and a final extension step at 72°C for 10 min. The sequencing libraries of each multiplex were constructed using a second PCR that attached adapters and sample-specific pairs of indices (10 bp unique sequences) to each side of the amplicons by targeting the universal sequence attached to the locus specific primers. The indexing PCR is set up in a volume of 5 µL using 5X Hot Firepol Multiplex master mix (Solis Biodyne), 1.25 µL of amplicon and 0.5 µM of each of the forward and

reverse adapters. The PCR conditions consisted in an initial denaturation at 95°C for 12 min followed by 15 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 59°C for 90 s, extension at 72°C for 30 s, and a final extension step at 72°C for 10 min. Libraries for each multiplex were then pooled, purified with 1.2× *SPRI magnetic beads* and sized using the Pippin Prep System (Sage Science; 2% agarose, 200-450 bp). We checked the library quality on a Tapestation 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and quantified it using QIAseq Library Quant Assay kit (Qiagen) on a Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems). An equimolar pool of the two multiplexes (W1 and W2) was finally sequenced on an Illumina iSeq100 sequencer with a 2 × 150 bp paired-end sequencing kit. A random subsample of 95 samples was genotyped twice to optimize the bioinformatic pipeline to each locus, estimate locus-level allelic error rate (number of allele mismatches between replicates divided by the total number of alleles compared), and finally select loci that produced repeatable genotypes for the final genotypic dataset.

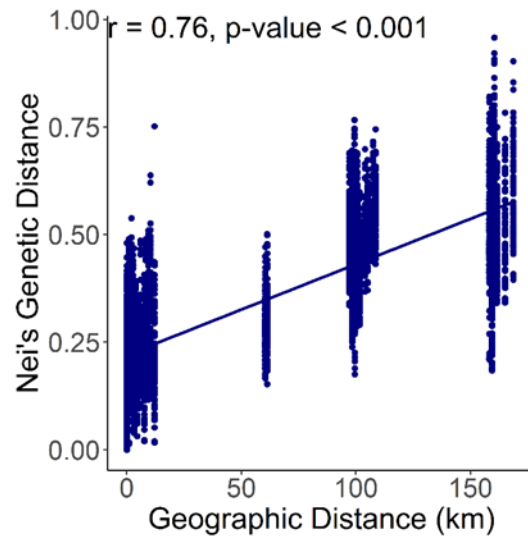
The bioinformatics analysis consisted in three steps: (1) sequence preparation and merging of sequence pairs with BBmerge v38.87 (Bushnell et al. 2017), (2) preliminary marker validation by comparing replicates and testing different bioinformatic parameters and (3) final genotyping using the optimal parameters on the validated markers.

Genotype calling from allele sequence was performed using FDS Tools (v1.2.0; (Hoogenboom et al. 2017)) embedded in a pipeline that compares the replicate genotypes to compute allelic error rate and format the results and associated locus and allele information (see (Lepais et al. 2020) for more details, documented pipeline available here: <https://data.inra.fr/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.15454/HBXKVA>). Sequence coverage of each allele was used to estimate allele dosage and determine complete tetraploid genotypes following (Cui et al. 2022). Microsatellite markers monomorphic across all individuals were removed from the dataset as well as those that display an excess of missing data over individual genotypes. This led to the selection of a final set of 31 microsatellite markers. We also removed individuals that display missing data, at least, one of the 31 microsatellites. After this filtering process, our genetic database consisted in a total of 110 individuals (over the 124 initially genotyped snails) fully genotyped at 31 microsatellite markers.

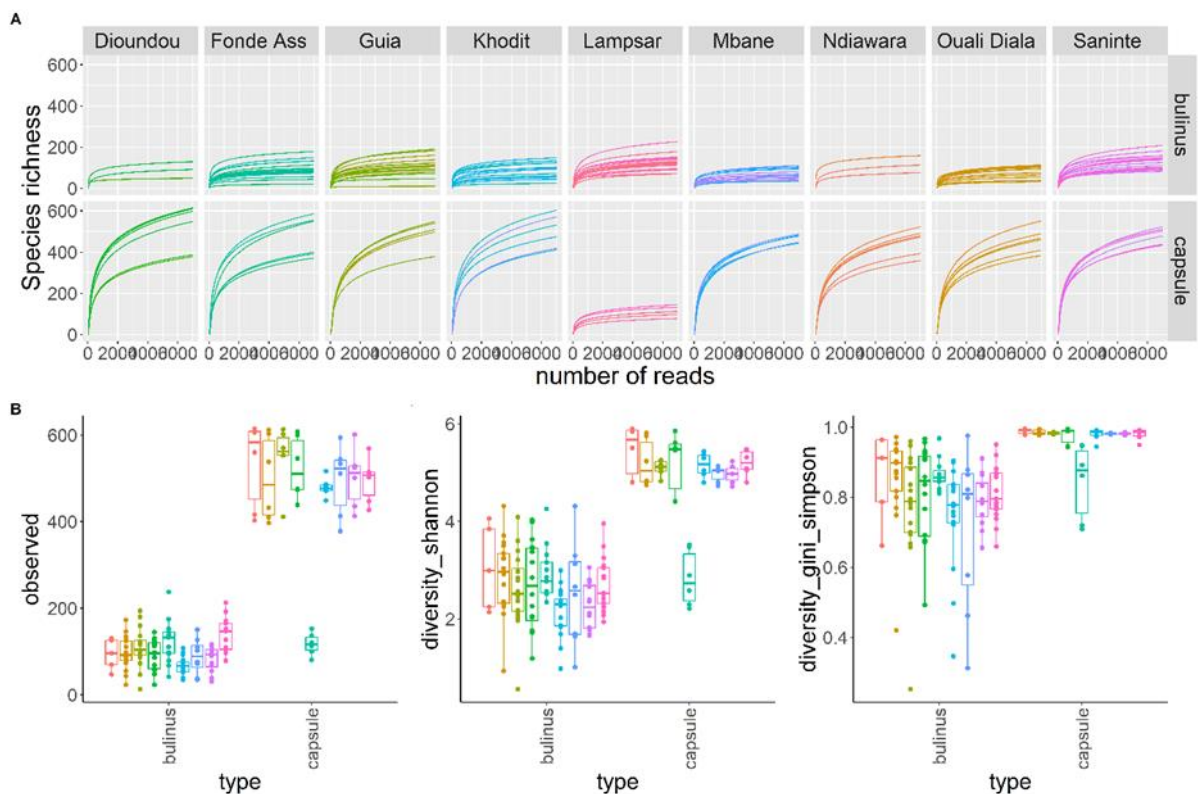
Suppl. table 1: Abundance of *B. truncatus*, trematode prevalence among sites

Locality	Habitat	X coordinate	Y coordinate	Sampling date	Number of shell extracted Bulinus	Trematode prevalence among the diagnosed shell extracted snails	Number of trematodes species	Volume of filtered water (L)
Ndiawara	River 1	16°35'04" N	14°50'58" W	11/02/2022	8	25%	Paramphistomoidea 1 (n=1) Paramphistomoidea 2 (n=1) <i>Petasiger sp.</i> (n=1)	6,5
Ouali Djala	River 1	16°35'56" N	14°56'10" W	11/02/2022	12	25%	Paramphistomoidea 1 (n=3) Paramphistomoidea 2 (n=3) <i>S. haematobium</i> (n=1)	10
Dioundou	River 1	16°35'50" N	14°53'22" W	12/02/2022	5	0	NA	10
Fonde Ass	River 1	16°36'20" N	14°57'38" W	12/02/2022	17	29%	<i>Haematolochus sp.</i> (n=5)	10
Khodit	River 1	16°35'45" N	14°56'42" W	13/02/2022	16	25%	<i>S. haematobium</i> (n=4) <i>S. bovis</i> (n=1) <i>Haematolochus sp.</i> (n=1)	5
Guia	Inlet	16°35'51" N	14°55'31" W	12/02/2022 14/02/2022	17	5.8%	<i>S. haematobium</i> (n=1) <i>Haematolochus sp.</i> (n=1)	5

Mbane	Lake	16°16'15" N	15°48'7"W	15/02/202 2	16	0	NA	2.8
Saneinte	Lake	16°14'32" N	15°48'6"W	15/02/202 2	17	0	NA	3.5
Lampsar	River 2	16°6'34"N	16°20'58" W	17/02/202 2	16	25%	<i>Orientocreadium batrachoides</i> (n=4) <i>S. bovis</i> (n=1)	18

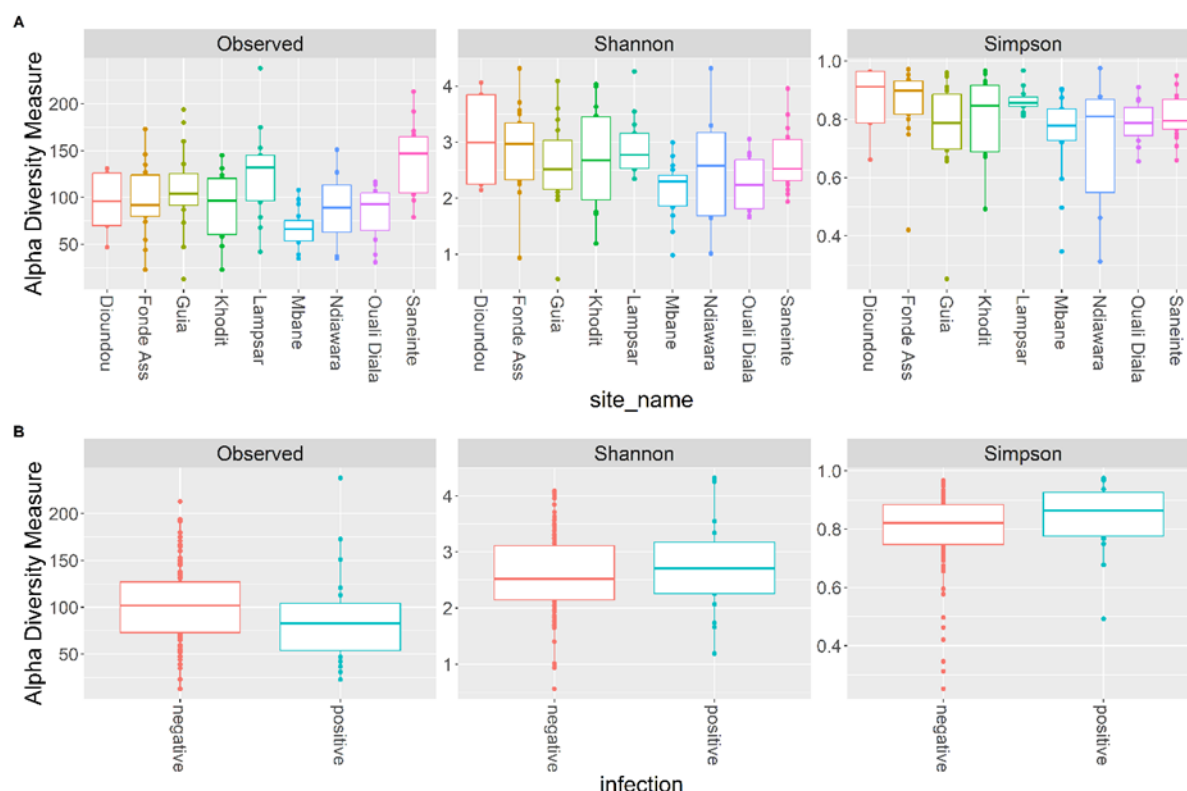


Suppl. fig 1: Scatterplot displaying Nei's genetic distance between individuals on 31 loci as a function of the geographic distance across sampling sites and showing a strong isolation by distance pattern.



Suppl. fig 2: Alpha diversity computed on the bacterial communities from the environmental water-sediment samples and isolated from *B. truncatus* snail hosts at each sampling site. (A) Rarefaction curves computed per sites and sample types (e.g. *B. truncatus* snails versus environmental samples) showing that all samples reached saturation at the chosen rarefaction threshold. (B) Indices of microbial alpha diversity as a function of sample type (e.g. *B. truncatus*

snails versus environmental samples) and sampling sites were significant when using observed ASV richness, Shannon's diversity index and Simpson's diversity index.



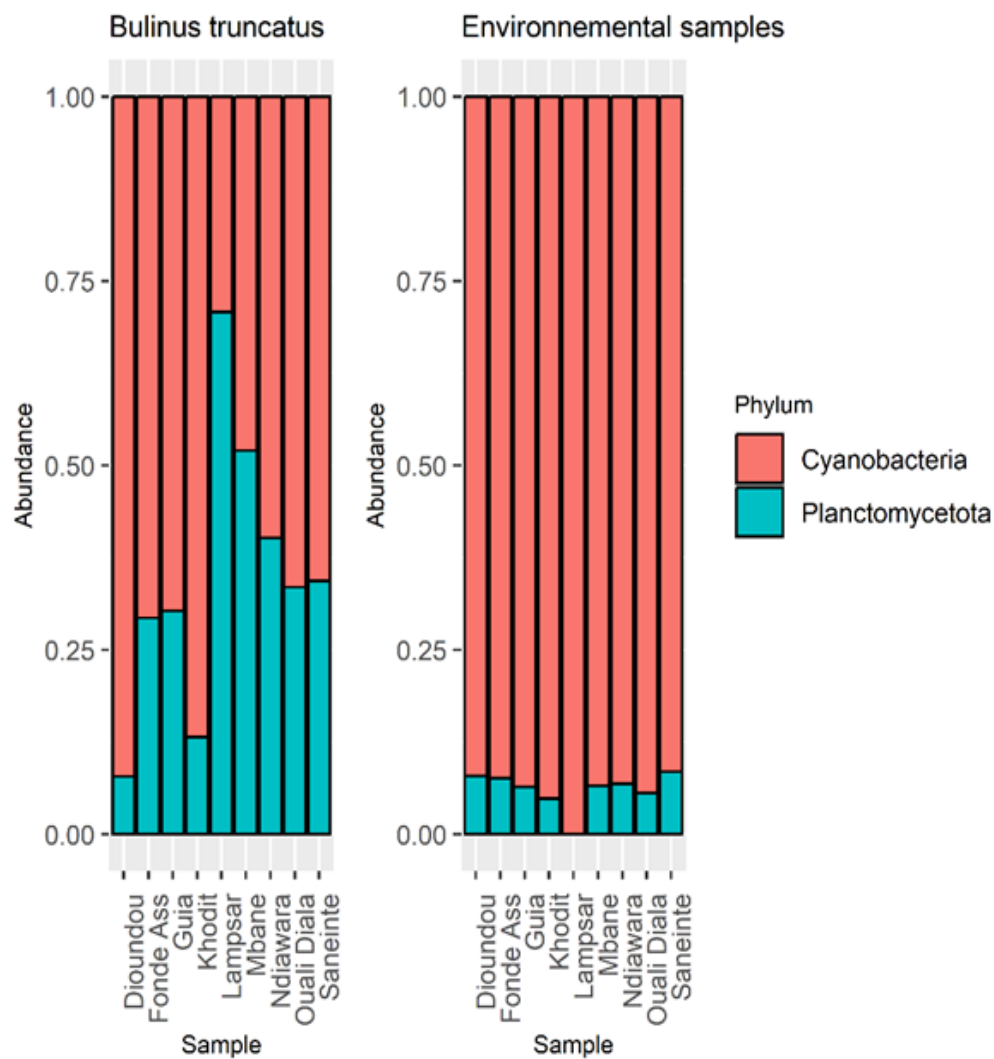
Suppl. fig 3: Alpha diversity computed on the bacterial communities isolated from *B. truncatus* snail hosts at each sampling site. Comparisons of alpha diversity indexes computed on snail host microbiota between snails hosts among sampling sites (A) and depending on the infectious status (B) using observed ASV richness, Shannon's diversity index and Simpson's diversity index.

Suppl. table 5: Results of Kruskal-Wallis test comparing the *B. truncatus* alpha-diversity depending on the sampling site of individuals based on ASV richness, diversity Shannon and Gini-Simpson indices revealing significant differences (all p-value < 0.05). Df = degree of freedom.

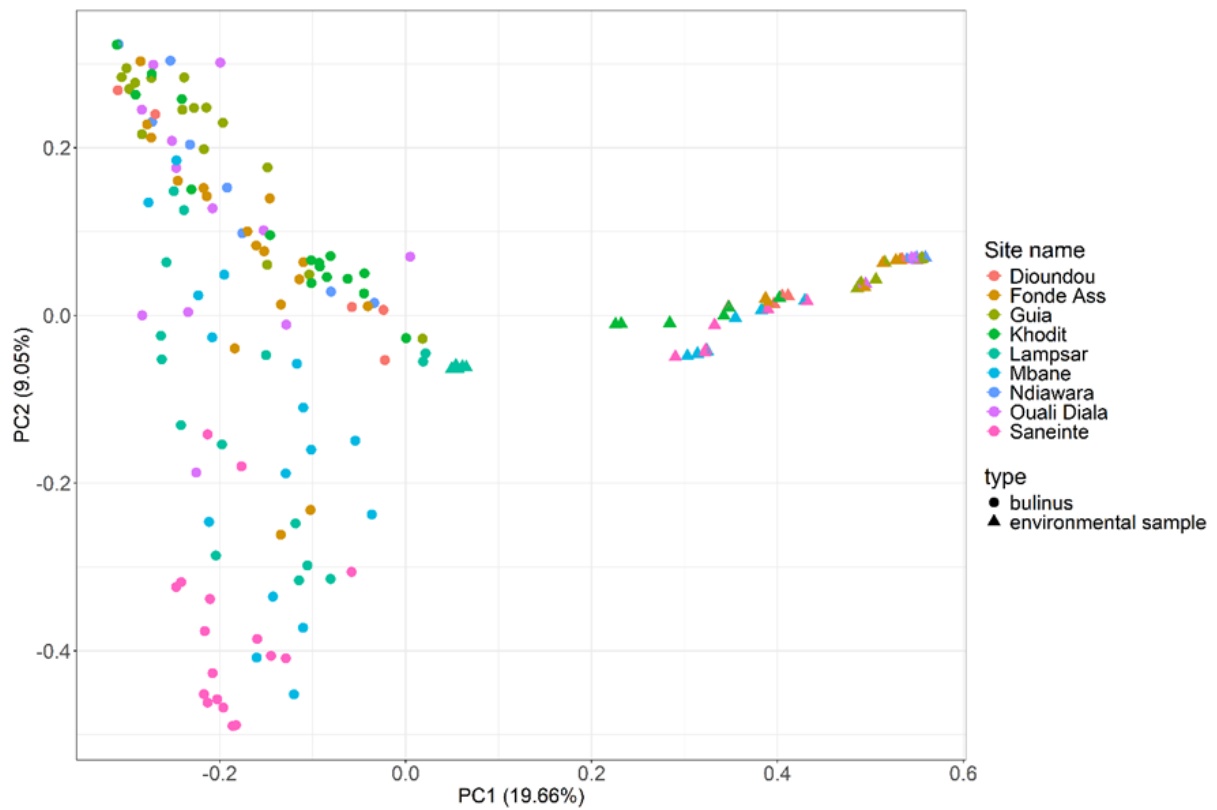
	Kruskal-Wallis Chi Squared	Df	p-value
ASV richness	32.536	8	< 0.05
Diversity Shannon	17.82	8	0.02262
Diversity Gini-Simpson	16.109	8	0.04085

Suppl. table 6: Results of Kruskal-Wallis test comparing the *B. truncatus* alpha-diversity depending on the infectious status of individuals based on ASV richness, diversity Shannon, and Gini-Simpson indices revealing no significant differences (all p-value > 0.05). Df = degree of freedom.

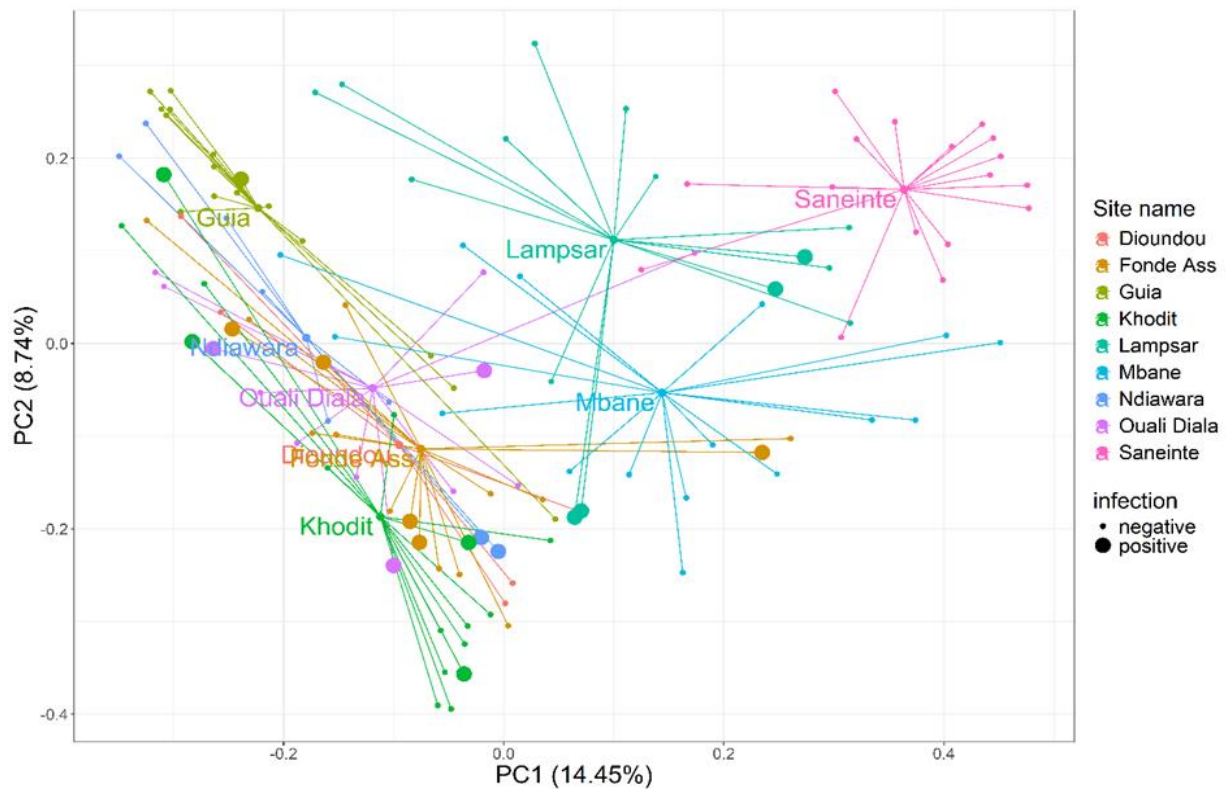
	Kruskal-Wallis Chi Squared	Df	p-value
ASV richness	2.7537	1	0.09703
Diversity Shannon	0.39046	1	0.5321
Diversity Gini-Simpson	2.1672	1	0.141
Pielou index	2.209	1	0.1372



Suppl. Fig 4: Relative abundance of Cyanobacteria and Plantomycetota phyla in environmental samples and *B. truncatus* snails among the different sampling sites.



Suppl. fig 5: Principal coordinate analysis (PCoA) plot showing environmental samples (triangles) and *B. truncatus* snail associated (dots) bacterial communities distributed along the two first PCoA axes computed based on pairwise Bray-Curtis distance obtained between each sample.



Suppl. fig 6: Principal component analysis (PCoA) plot showing the bacterial communities of *B. truncatus* snails according to their original sampling sites (see color legend), and to their infectious status (dot size) distributed along the two first PCoA axes based on pairwise Bray-Curtis distance computed between each sample. Each colored small dot represents one snail host from a given sampling site. Large dots are snail hosts positive to trematode molecular diagnosis. Medium dots are the centroids of the bacterial communities of snails originating from each sampling site.

Suppl. table 7: Results of PERMANOVA analysis comparing the *B. truncatus* beta-diversity based on Bray-Curtis distance revealing significant differences depending on the sampling site but not on the infectious status of the hosts. Df = degree of freedom, F = F-statistic. The significant values are in bold.

	Df	Sum of squares	R ²	F	P-value
Site	1	3.583	0.09184	12.197	< 0.05
Infection	1	0.384	0.00984	1.307	0.1263
Site:infection	1	0.380	0.00973	1.292	0.1359

II. Conclusion

Nos travaux ont permis de montrer que le microbiote des bulins diffère des communautés de bactéries trouvées dans l'environnement aquatique dans lequel ils se trouvent, et ce à la fois en termes de diversité alpha et bêta. Les communautés bactériennes associées aux gastéropodes sont moins complexes que celles présentes dans l'environnement. Néanmoins, nos résultats montrent que certaines bactéries environnementales sont également retrouvées dans le microbiote des bulins, ce qui suggère que les hôtes agissent comme des filtres qui amplifient certaines bactéries qui leurs sont nécessaires.

Les microbiotes des bulins sont structurés spatialement et présentent un fort motif d'isolement par la distance, c'est-à-dire que la similarité des communautés bactériennes associées aux bulins diminue quand la distance géographique entre bulins (ou populations de bulins) augmente. Ce motif est également retrouvé dans les communautés bactériennes environnementales et était plus marqué que chez les hôtes bulins. Ainsi, à distance géographique égale, les communautés bactériennes associées aux bulins sont moins différentes que les communautés bactériennes environnementales, ce qui renforce cette idée de 'filtre bactérien' exercé par les bulins. Quand on s'intéresse aux facteurs structurant ces communautés, il en ressort que la différenciation génétique entre bulins et la distance géographique entre bulins sont les principaux facteurs expliquant cette composition et structuration des microbiotes des escargots. Ainsi, le patron de phyllosymbiose observé entre différentes espèces d'escargots d'eau douce et leur microbiote semble s'appliquer également à l'échelle intra-spécifique. En revanche, ni les communautés bactériennes environnementales ni le statut d'infection des bulins par des trématodes ne permet de prédire la composition des communautés de bactéries associées aux bulins.

Nos résultats montrent que l'histoire évolutive et la distance géographique influencent fortement les communautés bactériennes associées aux populations naturelles de *B. truncatus* au Sénégal. Malgré ce patron général, certaines populations proches génétiquement et géographiquement présentent des différences dans la composition de leur microbiote, suggérant que les facteurs étudiés ne suffisent pas à expliquer toute la diversité des microbiotes de *B. truncatus*. D'autres facteurs écologiques ou traits physiologiques des hôtes pourraient, de fait, également jouer un rôle dans la structuration de ces communautés.

Par ailleurs, chez des souches de laboratoire de *Biomphalaria glabrata*, l'abondance relative de certaines bactéries (i.e., *Gemmatimonas aurantiaca* et *Micavibrio aeruginosavorus*) est liée à des allèles également impliqués dans la sensibilité du mollusque à l'infection par *Schistosoma mansoni* (Allan *et al.* 2018; Clec'h *et al.* 2022). Ainsi, chez *Biomphalaria*, autre espèce

vectrice de *Schistosoma*, il existe également un lien entre génétique et composition du microbiote mais qui va même plus loin puisqu'il relie ces éléments à la compétence du mollusque pour le parasite. Cette étude, et les résultats qui découlent de ma thèse démontrent ainsi l'importance de prendre en compte le fond génétique des hôtes dans les études sur la relation entre le microbiote et la compétence des mollusques pour des parasites du genre *Schistosoma* et plus généralement pour les trématodes.

Enfin, afin d'approfondir ces recherches, il aurait été intéressant d'effectuer un suivi à la fois spatial mais également temporel des communautés bactériennes liées aux bulins. En effet, un suivi temporel du microbiote d'individus d'une même population, généralement très limitée en termes de diversité génétique chez cette espèce, permettrait d'identifier des facteurs environnementaux qui pourraient potentiellement influencer les communautés de bactéries associées aux hôtes. Dans le cas de *B. truncatus*, les populations issues d'habitats avec de fortes fluctuations environnementales temporelles, tels que les mares temporaires au gré des saisons sèches et humides, pourraient être ciblées. Plus généralement, des études de suivi temporel du microbiote des gastéropodes des régions plus tempérées avec d'importants changements environnementaux saisonniers aideraient à mieux comprendre les facteurs environnementaux potentiels influençant le microbiote des gastéropodes d'eau douce. De fait, j'ai réalisé une telle étude sur le modèle *G. truncatula* au cours de ma thèse et les résultats qui en découlent sont encore en cours d'analyse mais discutés partiellement en discussion générale.



Chapitre 2

Les sucres naturels des plantes modulent la survie, l'alimentation sanguine et la compétence d'*Aedes albopictus* pour les virus de la dengue et du chikungunya

I. Contexte et objectifs

La suite de cette thèse se déroule non pas sur le terrain mais en laboratoire, au sein du Vectopole de l'IRD de Montpellier. Les objectifs de ce second chapitre sont (i) D'évaluer les effets de plusieurs types de diètes sur la survie d'*Ae. albopictus*; (ii) De quantifier la proportion d'individus positifs au fructose en lien avec chaque diète; (iii) De caractériser les effets de plusieurs types de diètes sur la compétence d'*Ae. albopictus* pour les virus du chikungunya et de la dengue; (iv) D'investiguer les potentiels mécanismes en observant les effets des différents types de diète sur la taille du repas sanguin, et sur le microbiote des moustiques. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique en cours d'écriture.

Comme mentionné en introduction, les femelles moustiques sont à la fois hématophages et phytophages. Il a été montré qu'elles pouvaient se nourrir sur diverses sources de jus sucrés incluant les nectars floraux et extra-floraux, le phloème et les fruits (Foster 1995). Cette source de sucre naturel provenant de plantes spécifiques fournit l'énergie métabolique au moustique mais peut également affecter certains de leurs traits biologiques ainsi que leur capacité à transmettre des pathogènes (Gu *et al.* 2011; Stone *et al.* 2012; Hien *et al.* 2016; Ebrahimi *et al.* 2018). Il a été démontré, par exemple, dans le modèle *Anopheles/Plasmodium* que les espèces de plantes sur lesquelles les moustiques se gorgeaient pouvaient influencer leur compétence vectorielle pour le pathogène (Hien *et al.* 2016). Cependant, les mécanismes sous-jacents n'ont pas été investigués. Il existe cependant plusieurs hypothèses : un effet direct de la plante sur le parasite via un ou des métabolites secondaires antiparasitaires ; un effet de la plante sur le microbiote de l'hôte qui lutterait contre le parasite ; un effet de la plante sur l'immunité de l'hôte ou un effet de la plante sur l'inoculum infectieux de départ de l'hôte.

Au vu des résultats obtenus sur *Anopheles/Plasmodium*, nous avons voulu tester l'effet potentiel de plantes à fleurs sur la compétence d'*Ae. albopictus* pour les arbovirus. Nous avons également voulu aller plus loin que ce qui a pour l'instant été publié en commençant à étudier quelques mécanismes par lesquels la plante pourrait agir sur la compétence. Pour ce faire, nous avons mesuré la taille des repas de sang, pour voir si l'effet potentiel était médié par une modulation de la taille de l'inoculum infectieux, et nous sommes en train de caractériser le microbiote bactérien des hôtes afin de voir si les plantes sont capables de moduler ce dernier.

Afin d'atteindre ces objectifs, j'ai choisi trois espèces de plantes à fleurs cueillies directement sur le site de l'IRD de Montpellier et j'ai laissé les moustiques émergents se nourrir dessus. En parallèle, j'ai utilisé deux contrôles : une solution de sucrose 10% (montré comme ayant un effet sur l'immunité d'*Ae. aegypti* (Almire *et al.* 2021) et souvent utilisé en routine pour maintenir les élevages de moustiques) et de l'eau osmosée (contrôle négatif). La première étape

de ces travaux a été d'évaluer l'impact des différents traitements sur la survie, le taux de positivité au fructose et le microbiote des moustiques. Le second objectif de ce chapitre est d'évaluer l'influence de ces traitements sur la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* pour les virus de la DEN et du CHIK. Après 5 jours de contact avec les plantes, j'ai infecté les femelles avec l'un des deux virus. Au moment de sélectionner les femelles gorgées, avant de les incuber, j'ai photographié tous les individus gorgés afin de mesurer la taille de leur abdomen à l'aide du logiciel ImageJ. Cette étape a été effectuée pour voir si le traitement reçu à l'émergence et jusqu'à l'infection avait un effet sur la taille du repas de sang infectieux. Puis, j'ai incubé mes individus dans des boîtes en carton, en insectarium de niveau 3 (BLS3). Tous les individus ont été maintenus sur du sucrose 10% et j'ai pu étudier la survie journalière (jusqu'à J14 post-infection), ainsi que les principaux traits de la compétence vectorielle à J7 et J14 post-infection. Pour ce faire, j'ai quantifié l'ARN viral par qPCR dans le corps (proxy du taux d'infection) et dans la tête (proxy du taux de dissémination) ; ainsi que la quantité de particules virales actives dans la salive (proxy du taux de transmission), me permettant ainsi d'explorer les principaux traits liés à la compétence vectorielle des moustiques. Le titrage infectieux permet de quantifier les particules virales actives dans la salive du moustique. La salive est recueillie, diluée et appliquée sur un tapis cellulaire. Le nombre de plages de lyse observées permet de déterminer le nombre initial de particules virales.

Concernant le microbiote, les données sont pour l'instant en cours d'acquisition donc aucun résultat ne sera présenté pour cette partie. Le second objectif de ce chapitre est d'évaluer l'influence de ces traitements sur la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* pour les virus de la DEN et du CHIK. Pour ce faire, j'ai exposé des moustiques aux différents traitements puis j'ai réalisé des infections expérimentales avec l'un des deux virus. A la suite de cette infection, tous les individus ont été maintenus sur du sucrose 10% et j'ai pu étudier la survie journalière, ainsi que les principaux traits de la compétence vectorielle à J7 et J14 post-infection (i.e. taux d'infection, taux de dissémination, efficacité de dissémination, taux de transmission, efficacité de transmission). J'ai également essayé d'aller plus loin en étudiant la taille du repas de sang infectieux afin de voir si le traitement reçu de l'émergence à l'infection avait un effet sur cette dernière. Ces travaux sont en cours de valorisation sous forme d'un article scientifique présenté dans ce chapitre et que nous souhaiterions soumettre à la revue PLoS Pathogens.



Figure 15 : Photo d'un couple d'*Aedes albopictus* qui s'est gorgé sur *Perovskia abrotanoides*. A gauche, le mâle reconnaissable à ses antennes plumeuses et à sa taille inférieure et à droite la femelle.

Publication n°2

Natural plant sugars modulate *Aedes albopictus* survival, blood-feeding, and competence for dengue and chikungunya viruses

Mathilde Jaquet ^{1,2}; Davy Jiolle ²; Théo Mouillaud ²; Isabelle Conclois ²; Eve Toulza ¹; Olivier Rey ¹; Benjamin Gourbal ¹; Christophe Paupy ²; Thierry Lefevre ²

¹ IHPE, UMR5244, Université de Montpellier, CNRS, IFREMER, UPVD, 66860, Perpignan, France

² MIVEGEC, Université de Montpellier, IRD, CNRS, 34394, Montpellier, France

Key-words: *Aedes albopictus*, arboviruses, plant-based diet, vector competence

Article en préparation

I- Introduction

The influence of diet on infectious diseases is particularly evident in tritrophic interactions involving herbivorous insects, their parasites, and larval food plants (Shikano 2017; Mayoral-Peña *et al.* 2020; Mogren and Shikano 2021). These plant-mediated effects are often attributed to the direct toxic effects of plant secondary metabolites on parasite development (Lefèvre *et al.* 2010), or variations in nutritional value that, in turn, affect host immunocompetence (Ponton *et al.* 2011).

Mosquitoes, as herbivorous insects, are part of a multitrophic system that includes plants, the bacterial communities (of both plants and mosquitoes) and viruses. Although female mosquitoes are largely known for their blood-feeding behavior, sugar sources such as nectar from floral and extrafloral nectaries, fruits, and phloem sap constitute a significant part of their diet and have notable biological implications (Foster 1995; Stone and Foster 2013). Females require those sugar-meals for their nutrition and energy (Foster 2022).

The ability of *Aedes* mosquitoes to transmit arboviruses is a multifaceted phenotypic trait, influenced by a combination of genetic factors from both the mosquito and the virus, environmental conditions, and the intricate interactions between these elements (Hardy *et al.* 1983; Franz *et al.* 2015; Kramer and Ciota 2015; Viglietta *et al.* 2021; Lewis *et al.* 2023). A crucial environmental factor in mosquito-pathogen interactions is the availability and quality of food resources. These have been shown to significantly affect host susceptibility, and immunocompetence, pathogen infectivity, and virulence, ultimately shaping disease dynamics (Ferguson and Read 2002; Lambrechts *et al.* 2006; Almire *et al.* 2021; Yan *et al.* 2023). All these studies have focused on quantitative changes (i.e., varying concentrations of sugar solutions), rather than qualitative aspects of the diet. To our knowledge, only one study has examined the impact of a specific type of sugar, demonstrating that alloose can limit the development of a murine malaria parasite in *Anopheles stephensi* mosquitoes (Mizushima *et al.*

2023). This study, like its predecessors, relied on artificial commercial sugar sources such as sucrose, glucose, or allose. However, female mosquitoes, like their male counterparts, ingest sugars from a wide array of plant species in addition to blood meals (Foster 2022). Natural plant nectar is not only composed of sugar, but also, to a lesser extent, primary metabolites such as amino acids, lipids, vitamins, and proteins, and secondary metabolites, such as terpenes, alkaloids, and phenolics (Baker & Baker, 1983; Nicolson, 2022). Nectar quality varies among flowering plant species with respect to the concentration and composition of these sugars and other constituents (Barredo & DeGennaro, 2020; Palmer-Young et al., 2019).

Under laboratory conditions, it has been shown that the species of flower on which *An. coluzzi* feeds can influence the level of infection by *Plasmodium falciparum* (Hien et al. 2016). The authors hypothesize that these effects may be due to a combination of plant secondary metabolites and the nutritional quality of the plant. The influence of natural plant diversity on mosquito competence for pathogens remains largely unexplored, particularly within *Aedes*-arbovirus interactions. In the case of *Aedes albopictus*, there are only studies showing that they also fed on plants (Barredo and DeGennaro 2020; Fikrig et al. 2020; Foster 2022; Upshur et al. 2023). But to our knowledge, no studies have looked into the link between the natural sugar-meals and their vector competence for arboviruses.

This study investigates the impact of a plant-based diet on mosquito susceptibility to arboviruses, focusing on the tritrophic interaction between the dengue (DENV) and chikungunya (CHIKV) arboviruses - both of which cause emergent, debilitating, and chronic diseases with no available vaccines or treatments - the mosquito *Ae. albopictus*, a major vector of arboviruses in Asia, North America and Europe, and a variety of peridomestic plant-derived sugar sources. We challenged *Ae. albopictus* females with viral strains of DENV and CHIKV using membrane feeding assays and conducted a series of experiments to examine the effects of plant sugar sources on key virus and mosquito traits that determine the intensity of arbovirus transmission: (i) mosquito survival on different diets, (ii) the proportion of fructose-positive mosquitoes, (iii) the size of subsequent blood meals following different diets, (iv) virus development within mosquito guts (infection), (v) the proportion of mosquitoes harboring the virus in their heads (dissemination), (vi) the proportion of mosquitoes harboring infectious viral particles in their saliva (transmission), (vii) transmission intensity, and (viii) mosquito survival following infection. Our preliminary results indicate that natural plant sugar sources could modify arboviral transmission.

II- Material and methods

1. Mosquito colony

Laboratory reared *Ae. albopictus*, IRD strain were obtained from a colony established in 2016 at the vectopole at the Institut de Recherche pour le Développement (Montpellier, France), from eggs collected in Montpellier. The colony was set up to hatch under standard insectary conditions (26°C, 80% relative humidity, 14:10 hour light-dark cycle). Larvae from the colony were randomly distributed into 24 × 34 × 9cm plastic trays containing 2L of osmotic water, at a constant density of 350 to 400 individuals per tray. Larvae were fed ad libitum with shrimp food (JBL Novo Prawn).

2. Viruses

The mosquitos were orally infected with low-passaged strains of CHIKV and DENV. The CHIKV strain (UVE/CHIKV/2006/RE/LR2006_OPY1) was isolated from a patient in February 2006 in La Reunion Island. Viral stocks were prepared after 11 passages of the isolate onto Vero cells maintained at 37°C. Supernatants were collected and the viral titer was estimated by serial 10-fold dilutions on Vero cells expressed in PFU/mL. The virus stock was divided into 1 mL aliquots and stored at -80°C until use.

The DENV-2 strain (UVE/DENV-2/2018/RE/47099) was isolated from a patient in March 2018 in La Reunion Island. Viral stocks were prepared after 7 passages of the isolate onto C6/36 cells maintained at 28°C. Supernatants were collected and the viral titer was estimated by serial 10-fold dilutions on C6/36 cells expressed in FFU/mL. The virus stock was divided into 1 mL aliquots and stored at -80°C until use.

3. Plant materials and mosquito feeding on plant sugar source

We selected three perennial flowering ornamental plants: *Lavandula angustifolia*, *Perovskia abrotanoides*, and *Scabiosa maritima* all collected in the garden of the IRD of Montpellier. The plants were selected based on (i) their abundance in the surrounding, (ii) their high concentration in nectar susceptible to provide a good survival, (iii) their diverse secondary metabolites, which could potentially affect vector competence. Flower bouquets (circa 300g) were added in 30 × 30 × 30 cm cages containing newly emerged male and female adults (**Fig. S1 A, B**). The base of the bunch was wrapped in moistened paper towels and an aluminum sheet (**Fig. S1 C**). The bouquets were changed daily in the cages (Hien *et al.* 2016; Paré *et al.* 2022, 2024). The 10% sucrose solution (positive control) and water (negative control) were provided in small Erlenmeyer flasks containing dental cotton and sealed with parafilm. Mosquitoes had permanent access to a food source, either 10% sucrose, water or plants. Mosquitoes can obtain sugars from various plant parts, including floral and extrafloral nectars, sap from stems, leaves, and seed pods,

as well as honeydew (Foster 2022). In this study, the specific sources of sugar consumed by mosquito females from plant cuttings were not identified. However, we can exclude honeydew and extrafloral nectaries, as our plants did not host aphids and our selected plant species lack extrafloral nectaries.

4. Experiment 1. Effects of plant diet on mosquito survival, sugar-positivity and microbiota

Ten (10) 30 x 30 x 30 cages (2 cages per diet treatment) containing 60 newly-emerged males and 60 females were set up to (i) follow the daily survival of individuals on the different treatments, (ii) perform the cold anthrone test to confirm sugar ingestion (2 days post-emergence) and (iii) dissect midguts and analyze female microbiota (5 days post-emergence). The flower bouquets and the 10% sucrose cotton pad were changed daily at 4 p.m. Mosquito survival was monitored from day 1 to day 15 post-emergence. Daily at 11 am, dead mosquitoes were counted and removed from the cages just before changing the bouquets.

The cold anthrone test, adapted from (Van Handel 1967), allows to test the presence of fructose (Briegleb *et al.* 1979). In an Erlenmeyer flask placed in an ice bath, 380 mL of sulfuric acid were added, followed by 150 mL of water. The mixture was allowed to cool under the hood. Once at room temperature, 750 mg of anthrone (Sigma, St. Louis, MO) were added until full dissolution.

After two days of treatment exposure (i.e. two-day old mosquitoes), a subset of 25 males and 25 females per cage (e.g. 50 males and 50 females per treatment) were randomly selected from the cages to perform the test. Mosquitoes were individualized into 1.5mL Eppendorf tubes. They were then crushed in 200 μ L of cold anthrone reagent using a piston pellet (washed with ethanol between each individual). After 1 hour of incubation at room temperature, the positivity of the reaction was assessed visually by detecting a color change. The color intensity was ranked visually from 0 (negative) to 4 (high fructose concentration) (**Figure S2**).

For the microbiota analysis, circa 7 (range 0-8) female midguts per treatment per cage were dissected after five (5) days of exposure to the different diets. Briefly, we anesthetized adult females for 10 min at -20°C . To remove potential contaminants from the insect surface, we gently soaked them individually in 1mL of 96 ethanol. We then rinsed them individually in 1mL of osmosed water. Finally, we transferred specimens onto a sterile microscope slide with sterile PBS 1 $\times$ on top of a plate and dissected the midguts using sterilized tweezers (Trouche *et al.* 2024). We preserved midgut samples at -20°C in PBS until further processing.

Total genomic DNA from each of the 67 (8 per diet x 2 cages except for water treatment) mosquitoes midgut was extracted using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Two extraction negative controls consisting of empty 1.5 ml tubes same as those used for mosquitoes preservation were added in the process. A total of 70 bacterial 16S metabarcoding libraries were prepared following the Illumina two-step PCR protocol; including the DNA extracts of the 67 mosquitoes midguts coming from the survival experiment, and 2 extraction negative controls and one PCR negative controls (millip water). We targeted the variable V3-V4 loops region of the 16S rDNA gene using the 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') primers (Klindworth et al. 2013) combined with universal Illumina adapters. The first PCRs were performed using the Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England BioLabs), in a 25 µL final volume containing 2 µL of template DNA and using a PCR program consisting in an initial denaturation step of 30s at 98°C followed by 32 cycles containing a denaturation step of 6 sec at 98°C, an annealing step of 30 sec at 55°C, and an elongation step of 8 sec at 72°C and ending with a final elongation step of 60 sec at 65°C. We used 5 µL of the PCR products to check the PCR products quality and integrity through electrophoresis on agarose gels. The 20 µL left were sent to the Bio-Environment platform (University of Perpignan Via Domitia, France). Libraries were performed using Illumina Nextera index kit and Q5 high fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Indexed PCR products were then normalized with SequalPrep plates (ThermoFisher) and paired-end sequenced on a MiSeq instrument using v2 chemistry (2 x 250 bp).

Raw data were processed using R (version 2023.03.0+386) using a pipeline based on the 'dada2' package (v. 1.28.0) (Callahan et al. 2016) on the IFB (French Institute of Bioinformatics) cloud. Briefly, this pipeline consists in removing primers from the obtained sequenced reads (max.mismatch = 1), trimming and quality filtering reads (minLen = 150, maxN = 0, maxEE = c(3, 3), truncQ = 2), denoising, dereplicating, merging paired-end reads (maxMismatch = 0), building the Amplicon Sequence Variant (ASV) table and removing potential chimeric sequences produced during the process (method = 'consensus'). The taxonomic assignment (multithread = TRUE, minBoot = 60) of the resulting filtered and cleaned ASVs was performed using the Ribosomal Database Project (RDP) classifier (Wang et al. 2007) and based on the Silva_train_set and silva_species_assignment 138.1 datasets (Quast et al. 2012). Eukaryotic, mitochondrial, and chloroplast sequences were removed, as well as ASVs not affiliated to 'Bacteria' at the Kingdom taxonomic levels. The obtained ASV sequence table was finally merged with the taxonomy database and the sample metadata matrix for subsequent analyses using the 'phyloseq' R package (v. 1.22.3) (McMurdie and Holmes 2013).

5. Experiment 2. Effects of plant diet on mosquito competence and blood-meal rate and size

Upon emergence, mosquito batches (circa 300 males and 300 females) from the colony were randomly assigned to one of five treatments: 10% sucrose solution, water only, *L. angustifolia*, *P. abrotanoides*, or *S. maritima* for a period of five days. This allowed mosquitoes ample time to access their designated sugar source, ensuring that all mosquitoes would have ingested a sugar meal at least once before experimental infection. Males and females were housed together to ensure insemination. After five days, female mosquitoes were transferred to cups for experimental infection (Fontaine *et al.* 2016). Experimental infections were done in a BLS3 laboratory (IRD Vectopôle, Montpellier, France). Before receiving the infectious blood-meal, 5-days-old females were starved/deprived of food source for 6 hours. The infectious blood meal was composed of two volumes of washed rabbit erythrocytes and one volume of viral suspension at the final concentration of 1×10^7 PFU/mL for CHIKV and 1×10^7 FFU/mL for DENV. Females were allowed to take an infectious blood meal for 20 min using a Hemotek membrane feeder system using a desalted porcine intestine as a membrane. Adenosine triphosphate was added to the blood meal as phagostimulant at the final concentration of 5 mM. Rabbit erythrocytes were obtained from arterial blood collected and washed the day before the experimental infection (Dubrulle *et al.* 2009). Engorged females were sorted on ice to assess blood feeding rate and blood meal size, then kept in groups of 30-35 individuals per cardboard container with access to sugar solution until dissection for virus detection. Females thus received the plant treatment only prior to infection. This experiment was conducted in 3 distinct replicates (replicate 1 in June 2023, replicate 2 in June 2024 and replicate 3 in July 2024).

(a) Feeding rate and blood-meal size measurement

Unfed females were counted to determine the feeding rate (proportion of blood-fed females among total females) and subsequently discarded, while the remaining engorged females were photographed to measure abdomen size (**Figure S3**). This approach allowed for assessing blood-meal size across treatments (Xiang *et al.* 2022). Photographs were captured using a DinoLite microscope and analyzed using ImageJ software (v 1.54g).

(b) Incubation and dissection of blood fed females and survival monitoring

Once the pictures were taken, females were incubated in cardboard cups of about 30 to 35 females in controlled conditions in a climatic chamber in the BSL3 ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% relative humidity, 14:10 hour light-dark cycle) with permanent access to 10% sucrose solution. At 7- and 14-days post-infection (dpi), circa 29 females (range 19-30) per treatment were anesthetized on ice, and their legs and wings were removed. Saliva was then collected by inserting the proboscis

into a 20µL pipette tip containing 20µL of fetal calf serum (FCS). After 30 min, saliva was transferred into wells of a 96-well plate containing 45µL of DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). The mosquitoes were then dissected on ice, with heads and bodies separated and placed individually in 2 mL tubes containing glass beads and 300 µL of DMEM with 2% FCS. All tubes and plates containing samples were stored at -80°C until further processing. Each day from 1 to 14 dpi, the number of dead mosquitoes per cardboard container was recorded to monitor survival.

(c) Virus detection and quantification

Infection and dissemination rates were determined by RT-qPCR of bodies and heads respectively, whereas transmission rate was determined either by plaque assay (for CHIKV) or by standard focus-forming assay (FFA, for DENV) of saliva from mosquitoes with a virus-positive head.

a) RNA extraction and qPCR

Head and body samples were homogenized/lysed using the FastPrep-24™ 5G (OMEGA Bio-Tek). From this homogenate, 100 µL was reserved in 96-well plates as a backup, and the remaining 100 µL was used for total RNA extraction with the NucleoSpin 96 RNA Blood kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's protocol. RNA was eluted in 65 µL RNase-free H₂O (Vazeille *et al.* 2007).

DENV and CHIKV RNA were detected from the total RNA extracted from mosquito parts (body and head). Absolute quantification of DENV RNA was performed using a one-step reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The assay used the SuperScript III Platinum One-Step Quantitative Kit with 1X reaction mix, 0.3 µM PCR primers (DF: 5'-AGGACYAGAGGTTAGAGGAGA-3'; DR: 5'-CGYTCTGTGCCTGGAWTGAT-3'), and 0.1 µM probe (5'-FAM-ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACC-TAMRA-3') (Gadia *et al.* 2017). Similarly, CHIKV RNA quantification used the same kit with 1X reaction mix, 0.3 µM PCR primers (CHIK-S: 5'-AAGCTYCGCGTCCTTTACCAAG-3'; CHIK-R: 5'-CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT-3'), and 0.1 µM probe (5'-FAM-CCAATGTCYTCMGCCTGGACACCTTT-TAMRA-3') (Pastorino *et al.* 2005). Amplification was performed on a LightCycler 480 real-time thermocycler (Roche Diagnostics) using the same program for both viruses: reverse transcription at 50°C for 30 minutes, polymerase activation at 95°C for 2 minutes, followed by 45 cycles of 15 seconds at 95°C and 45 seconds at 60°C (Thirion *et al.* 2019).

For absolute quantification, a standard curve per virus was generated in triplicate using 10-fold serial dilutions (ranging from 10^3 to 10^9 RNA copies/ μ L of reaction) of total DENV and CHIKV RNA of known concentration. For that, a mARN sequence per virus was targeted and ordered at Eurofins Blue Heron Biotech.

b) Titration assay

RNA viral copy number can give an overestimation of infectious viral particles and is more appropriate to describe viral dissemination than to estimate transmission probability (Dhakal *et al.* 2021). Either plaque assay (CHIKV) or FFA (DENV), quantifying the infectious viral particles amount per saliva, were performed to estimate transmission.

For CHIKV plaque assay, vero cells were seeded in a 6-well plate and grown overnight. Pure saliva samples were diluted to $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{20}$. The culture medium was removed and cells were inoculated with 125 μ L of diluted saliva. After incubation at 37°C and 5% CO₂ for 1h, the inoculum was removed and cells were covered with 150 μ L/well of a 1:1 mix of overlay medium (DMEM, 0.1% 2x penicillin/streptomycin, 2x antibiotic-antimycotic (Life Technologies) and 4% FBS) and 3.2% methylcellulose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) solution, and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 3 days. Cells were fixed at room temperature (20-25°C) by adding 150 μ L/well of 3.6% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min. Then, cells were washed three times with PBS, and incubated with 150 μ L/well of 0.4% crystal violet (Sigma-Aldrich) in 3% formaldehyde at room temperature for 45 min. After three washes in water, CHIKV presence was observed (Jiolle *et al.* 2021). CHIKV presence in saliva was determined by counting foci by the naked eye and converting them into PFU/saliva.

For DENV, virus titration was performed by FFA modified from a published protocol (Fontaine *et al.* 2016). This assay relies on inoculation of diluted saliva sample ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{200}$) onto a sub-confluent culture of C6/36 cells, followed by incubation and subsequent visualization of infectious foci by indirect immunofluorescence. Briefly, C6/36 cells were seeded in a 96-well plate and grown overnight. Serial dilutions were prepared in Leibovitz's L-15 medium supplemented with 0.1% penicillin [10,000U/mL] / streptomycin [10,000 μ g/mL], 1x non-essential amino acids and 2% FBS. The culture medium was removed and cells were inoculated with 40 μ L/well. After 1 hour of incubation at 28°C, the inoculum was removed and cells were overlaid with 150 μ L/well of a 1:1 mix of overlay medium (Leibovitz's L-15 medium, 0.1% penicillin [10,000 U/mL]/streptomycin [10,000 μ g/mL], 1x non-essential amino acids, 2x

Antibiotic-Antimycotic (Life Technologies), and 10% FBS) and 3.2% carboxymethylcellulose solution, and incubated for 5 days at 28 °C. Cells were fixed by addition of 150 µL/well of 3.6% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and incubation at room temperature (20–25°C) for 20 min. The overlay and fixative were removed and the cells were washed three times with PBS, followed by 30min permeabilization with 50µL/well of 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in PBS at room temperature. The cells were washed three times in PBS and incubated for 1 hour at 37°C with 40µL/well of mouse anti-dengue virus complex monoclonal antibody MAB8705 (Merck Millipore, Molsheim, France) diluted 1:200 in PBS+ 1% bovine serum albumin (BSA) (Interchim, Montluçon, France). After another three washes in PBS, cells were incubated at 37 °C for 30 min with 40µL/well of an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse antibody (Life Technologies) diluted 1:500 in PBS + 1% BSA. After three more washes in PBS and a final wash in ultrapure water, infectious foci were counted under a fluorescent microscope and converted into focus-forming units/saliva (FFU/saliva).

Detection of viruses in varying mosquito tissues using RT-qPCR (body and head) or FFA (saliva) enabled the determination of several key parameters characterizing mosquito competence for CHIKV and DENV, specifically:

- Infection rate (IR): the proportion of mosquitoes with infected bodies (abdomen and thorax) among qPCR-tested mosquitoes.
- Disseminated rate (DR): the proportion of mosquitoes with qPCR-positive heads among body-positive mosquitoes.
- Dissemination efficiency (DE): the proportion of mosquitoes with qPCR-positive heads among all qPCR-tested mosquitoes.
- Transmission rate (TR): the proportion of mosquitoes with infectious saliva among mosquitoes with qPCR-positive heads.
- Transmission efficiency (TE): the proportion of mosquitoes with infectious saliva among all tested mosquitoes. Note that for CHIKV, TE could not be calculated because only mosquitoes with qPCR-positive heads were included in the titration assay. This approach was adopted for practical constraints: CHIKV plaque assays were conducted on 6-well plates rather than the 96-well plates used for DENV. Testing only head-positive individuals minimized the number of plates required.
- Viral load: the number of infectious particles per saliva, either in PFU (Plaque Forming Units) for CHIKV or FFU (Focus-Forming Units) for DENV.

Infection and dissemination intensity were assessed using absolute quantification, but this was only performed in the third replicate. Consequently, intensity results for IR, DR and DE are not available for the first two replicates. The only intensity results included in the manuscript are the results of the titration assay, either in PFU for CHIKV or FFU for DENV.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed in the R statistical environment (v4.3.0) (R Core Team 2023).

Experiment 1.

A Cox's proportional hazard mixed regression model using the 'coxme' function from the 'coxme' R package (v2.2-22) (Therneau 2024) with censoring and with cage set as a random effect was performed to test the effect of treatment (five levels: water, 10% sucrose, *L. angustifolia*, *P. abrotanoides*, or *S. maritima*), mosquito sex (2 levels), and their interaction on mosquito survivorship from 1 to 15 day post-emergence. Logistic regression by generalized mixed linear models (GLMM, binomial errors, logit link; "lme4" library version 1.1-32; Bates et al., 2015) with cage identity set as a random effect was used to test the effect of treatment, mosquito sex, and their interaction on the proportion of mosquitoes positive to cold-anthrone.

Experiment 2.

The effect of treatment (5 levels), virus (DENV or CHIKV), and time point (7 vs. 14 dpi, relevant only for replicates 1 and 3, see table1) and their interaction on (i) blood feeding rate, (ii) IR, (iii) DR, and (iv) DE was examined with binomial GLMMs with replicate set as a random effect. For TR and TE, the low number of positive saliva samples led to complete separation in our data. To address this, we applied a bias-corrected method, running the GLMMs for each virus separately using the bglmer function from the blme library (Dorie *et al.* 2024). The effect of treatment on the number of infectious virus particles (viral load) was analyzed for each virus using zero-inflated negative binomial GLMMs with replicate set as a random effect (glmmTMB package [23]). We used a GLMM with Gaussian errors, including replicate and feeder identity as random effects, to test the effects of treatment, virus, and their interaction on log-transformed blood meal size. Finally, Cox's proportional hazard mixed regression model with censoring and with replicate set as a random effect was performed to test the effect of treatment, virus, and their interactions on mosquito survivorship from 1 to 14-day post-infection. For each model, The 'Anova' function from the 'car'

package (v3.1-3, Fox *et al.* 2024) was used to estimate the significance of terms. When treatment was significant, multiple pairwise post hoc tests were used to compare each diet level using the ‘emmeans’ library (Lenth *et al.* 2024).

Table 1 below summarizes all the traits measured and analyzed for each of the two experiments and replicates.

	Only one replicate		
Exp. 1	Daily survival from day 1 to day 15 days post-emergence	Sugar positivity (cold anthrone test)	Microbiota (analysis in progress)

Exp. 2	#1 replicate				#2 replicate				#3 replicate			
Blood feeding rate												
Blood meal size												
Daily survival post-infection until 14 dpi												
Vector competence traits	7 dpi		14 dpi		7 dpi		14 dpi		7 dpi		14 dpi	
	CHIK V	DEN V	CHIK V	DEN V	CHIK V	DEN V	CHIK V	DEN V	CHIK V	DEN V	CHIK V	DEN V
IR												
DR												
DE												
TR												
TE												

Table 1: summary of the measured traits for each experiment and replicate (green: trait measured, white: trait not measured).

III- Results

Experiment 1

1) Effect of treatment on the survival of male and female mosquitoes

Mosquito survival rate varied among the different treatments (LRT $\chi^2 = 237.8$; $p < 2.2 \times 10^{-16}$, **Figure 1**) and was higher in females than in males (LRT $\chi^2 = 375.6$; $p < 2.2 \times 10^{-16}$). There was an interaction between treatment and sex (LRT $\chi^2 = 38.9$; $p = 7.46 \times 10^{-8}$) such that the effect of treatment on mosquito survival varied with sex. Specifically, in females, water led to the lowest survival rate, followed by *S. maritima*, *L. angustifolia*, *P. abrotanoides* and 10% sucrose. In males, water also led to the lowest survival rate, but there was no difference among the other treatments.

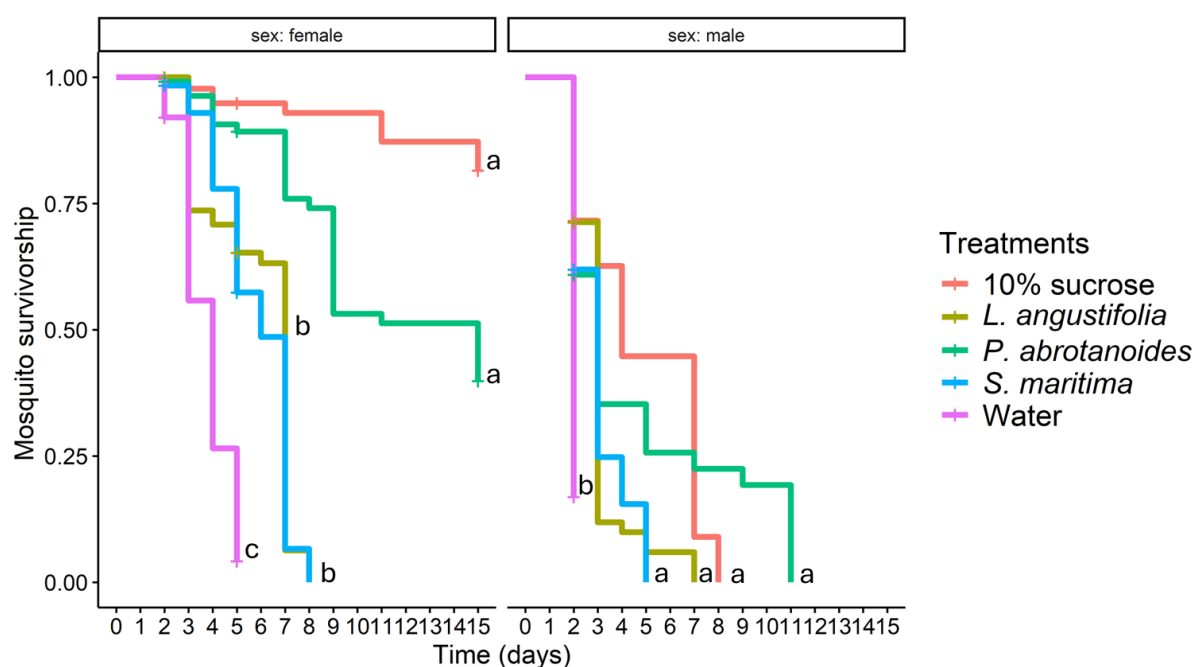


Figure 1. The effect of 3 plant species, water and a 10% sucrose control solution on the survival of *Aedes albopictus* females (left panel) and males (right panel). Kaplan-Meier curves represent the proportion of surviving mosquitoes over time for each treatment. Different letters denote statistically significant differences based on post-hoc multiple comparison tests.

2) Cold anthrone test for evaluating plant-feeding rate

The cold anthrone test was carried out on a mean subset of 24 adults per cage (min = 8, max = 26) after 48 hours of contact with the diets. Overall, the proportion of fructose-positive mosquitoes strongly varied among treatments (LRT $\chi^2 = 51.3$; $p < 1.98 \times 10^{-10}$) and among sexes with males showing higher rates (LRT $\chi^2 = 8.3$; $p = 0.004$; **Figure 2**). In females, fructose positivity ranged from $0.14 \pm 0.05\%$ in *L. angustifolia*, to $0.18 \pm 0.06\%$ in water, $0.4 \pm 0.07\%$ in *S. maritima*,

0.46 ± 0.07% in *P. abrotanoides*, and 0.66 ± 0.07% in 10% sucrose. In males, fructose positivity ranged from 0% in *L. angustifolia*, to 0.05 ± 0.05% in water, 0.58 ± 0.07% in *S. maritima*, 0.65 ± 0.07% in *P. abrotanoides*, and 0.84 ± 0.05% in 10% sucrose.

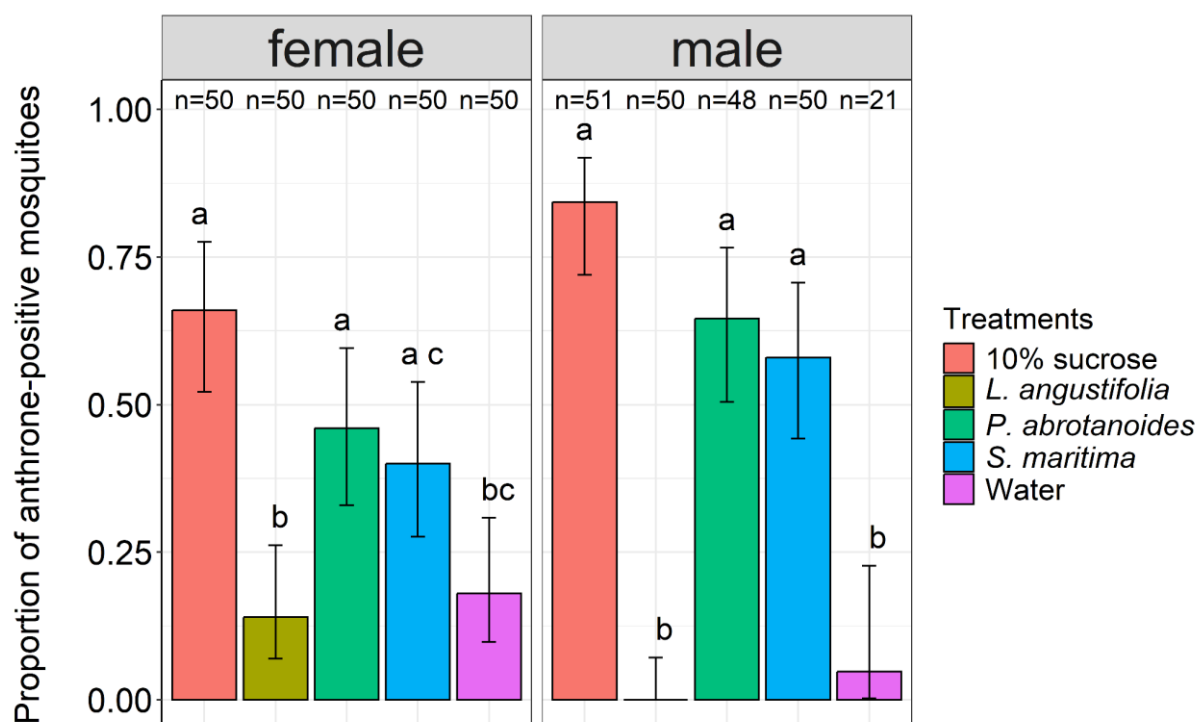


Figure 2. Proportion of *Aedes albopictus* (males and females) tested positive for fructose after exposure to one of five diets: water, 10% sucrose solution, *Lavandula angustifolia*, *Perovskia abrotanoides*, and *Scabiosa maritima* for 48 h. “n=” indicates the total number of mosquitoes tested for each treatment/diet. The error bars represent the variability of data with 95% confidence interval (±95% CI). Different letters above the bars denote statistically significant differences based on post-hoc multiple comparison tests.

3) Influence of pre-infection diet on mosquito microbiota

For this part, the analyses are still in progress.

Experiment 2

1) Influence of pre-infection diet on mosquito blood-feeding

a. Blood-feeding rate

The treatment received by mosquitoes during the first 5 days of their adult life (from emergence until the day of infection) influenced their feeding rate on infectious blood (LRT $\chi^2_4 = 49$; $p < 0.001$, **Figure 3**). In particular, the blood-feeding rate of mosquitoes was highest when previously maintained on **Russian sage/Perovskia** (0.63) followed by 10% sucrose (0.56), water (0.54), **pincushion/Scabiosa** (0.49), and lavender (0.48). There was no effect of virus (LRT $\chi^2_1 = 2.7$; $p = 0.1$; **Figure 3**) and no virus by treatment interaction (LRT $\chi^2_4 = 6$; $p = 0.2$; **Figure 3**) on mosquito blood-feeding rate. Detailed feeding rates for each of the three replicates are given in **Figure S4**.

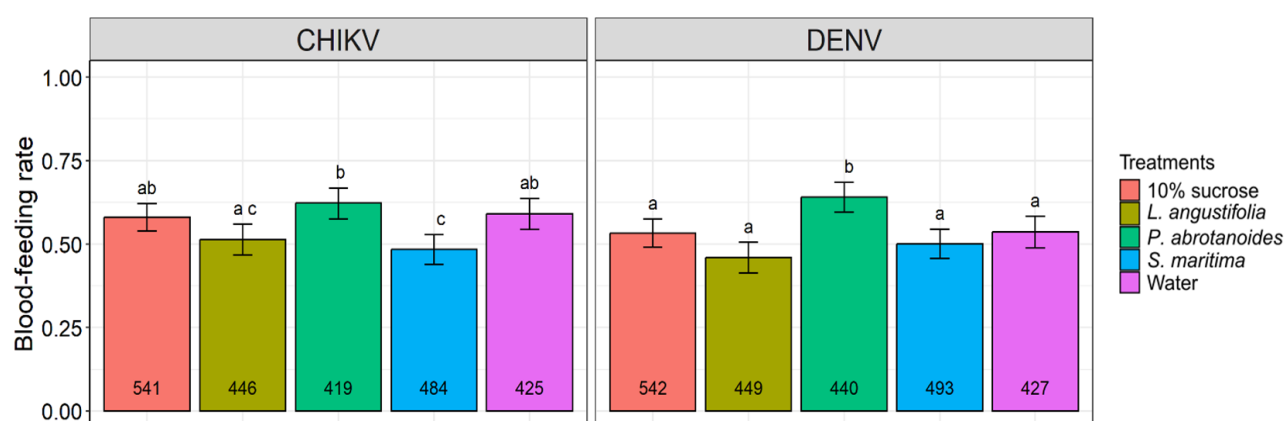


Figure 3. Effect of 3 plant species, water and a 10% sucrose control solution on the blood-feeding rate of mosquitoes exposed to either DENV or CHIKV infectious blood. Each bar represents the blood-feeding rate, expressed as the number of blood-fed females out of the total number of mosquitoes exposed to the blood for each treatment and each virus over all 3 replicates. The numbers in the bars represent the sample size for each treatment and virus. The error bars represent the 95% confidence interval. Different letters above the bars denote statistically significant differences based on post hoc multiple comparison tests for each virus separately.

b. Blood meal size

Mosquito blood meal size was measured in replicates two and three. For both viruses, the treatment had a significant effect on blood meal size (CHIKV: LRT $\chi^2_4 = 11.6$; $p = 0.02$; DENV: LRT $\chi^2_4 = 100$; $p < 0.001$; **Figure 4**). Specifically, individuals maintained on a 10% sucrose solution had smaller blood meal sizes compared to those in the other treatment groups. However, the pairwise comparisons for CHIKV did not remain significant after adjusting for multiple tests. The virus had no effect on the blood meal size (LRT $\chi^2_1 = 1.48$; $p = 0.225$). The interaction between the treatment and the virus on the blood meal size was not significant (LRT $\chi^2_4 = 9.42$; $p = 0.051$). Detailed blood meal size for each of the two replicates are given in **Figure S5**.

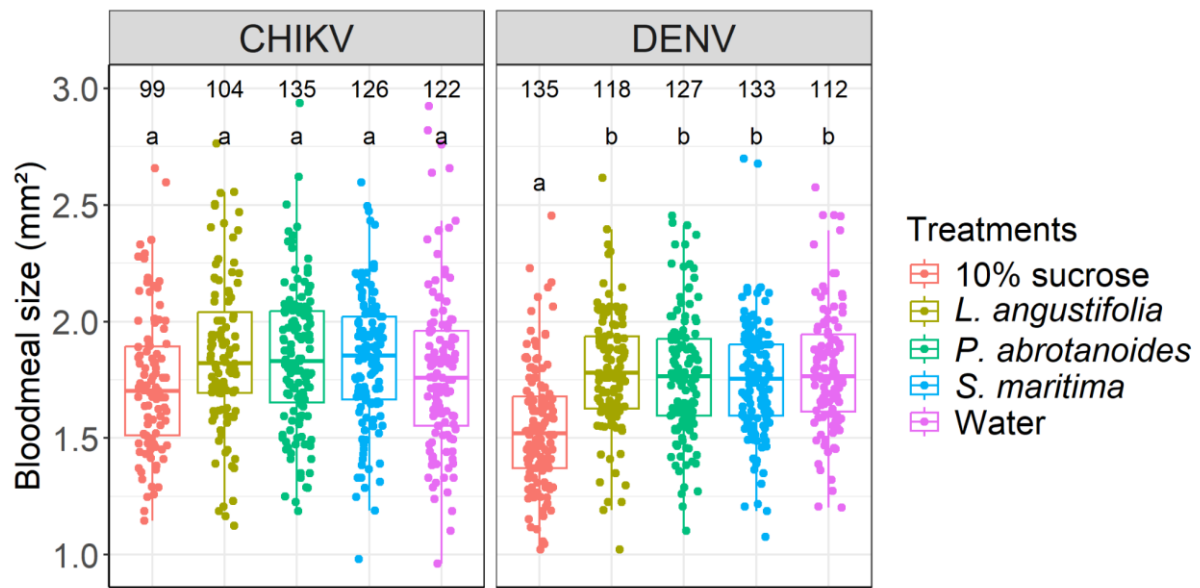


Figure 4. Effect of 3 plant species, water and a 10% sucrose control solution on the blood meal size of mosquitoes exposed to either DENV or CHIKV infectious blood over replicates 2 and 3. The numbers above the boxplots represent the sample size for each treatment and virus. Different letters denote statistically significant differences based on post hoc multiple comparison tests for each virus separately.

c. Infection, dissemination and transmission analysis

Infection rate (IR), dissemination rate (DR) and dissemination efficiency (DE) were quantified using qPCR on mosquito bodies and heads, respectively. These traits were measured at 7 dpi across all 3 replicates and at 14 dpi for replicates 1 and 3 (**Table 1**). Transmission rate (TR) and efficiency (TE) were quantified using titration assay on Vero cells for CHIKV and on C6/36 cells for DENV. TR and TE were measured at 7 dpi for replicate 2 and at both 7 and 14 dpi for replicate 3 (**Table 1**).

i) Influence of pre-infection diet treatment on IR, DR and DE at **7 dpi across all three replicates**

IRs, quantified at 7 dpi on mosquito bodies were generally high, with mosquitoes exposed to CHIKV showing a slightly lower IR (0.785; 344/448) compared to DENV (0.852; 369/433) (LRT $\chi^2_1 = 7$; $p = 0.008$). Diet treatment significantly influenced IR for both CHIKV (LRT $\chi^2_4 = 59$; $p < 0.001$) and DENV (LRT $\chi^2_4 = 13.6$; $p = 0.008$) (**Figure 5A**). Compared to the 10% sucrose control, mosquitoes maintained on plants or water alone were more likely to become infected with CHIKV.

Similarly, mosquitoes maintained on water or on *P. abrotanoides* showed higher DENV IR than those maintained on 10% sucrose. A significant virus-by-treatment interaction was observed, with the difference in IR between the 10% sucrose control and other treatments being more pronounced for CHIKV than for DENV (LRT $\chi^2_4 = 12.8$; $p = 0.01$; **Figure 5A**).

The dissemination rate (DR), measured at 7 dpi in mosquito heads, was nearly twice as high in mosquitoes exposed to DENV (0.571; 210/368) compared to those exposed to CHIKV (0.298; 102/342) (LRT $\chi^2_1 = 56$; $p < 0.001$) (**Figure 5B**). Diet treatment significantly affected DR in DENV-exposed mosquitoes (LRT $\chi^2_4 = 31$; $p < 0.001$) but not in those exposed to CHIKV (LRT $\chi^2_4 = 4.63$; $p = 0.3$) (**Figure 5B**). For DENV, the highest DR was observed in mosquitoes fed on *P. abrotanoides*, followed by *L. angustifolia*, water, *S. maritima*, and the lowest in 10% sucrose. A significant virus-by-treatment interaction was detected (LRT $\chi^2_4 = 11.8$; $p = 0.01$; **Figure 5B**).

For the dissemination efficiency (DE) evaluated at 7 dpi in mosquito heads compared to the body qPCR positive mosquitoes, the results were similar to the DRs with an effect of the virus (LRT $\chi^2_1 = 59$; $p < 0.001$; **Figure 5C**). There was an effect of the treatment for DENV-exposed mosquitoes (LRT $\chi^2_4 = 44$; $p < 0.001$) but not for CHIKV (LRT $\chi^2_4 = 3.73$; $p = 0.4$; **Figure 5C**). A significant virus-by-treatment interaction was detected (LRT $\chi^2_4 = 18$; $p = 0.001$; **Figure 5C**).

Detailed IR, DR and DE at 7 dpi for each of the three replicates are given in **Figure S6, S7, S8** respectively.

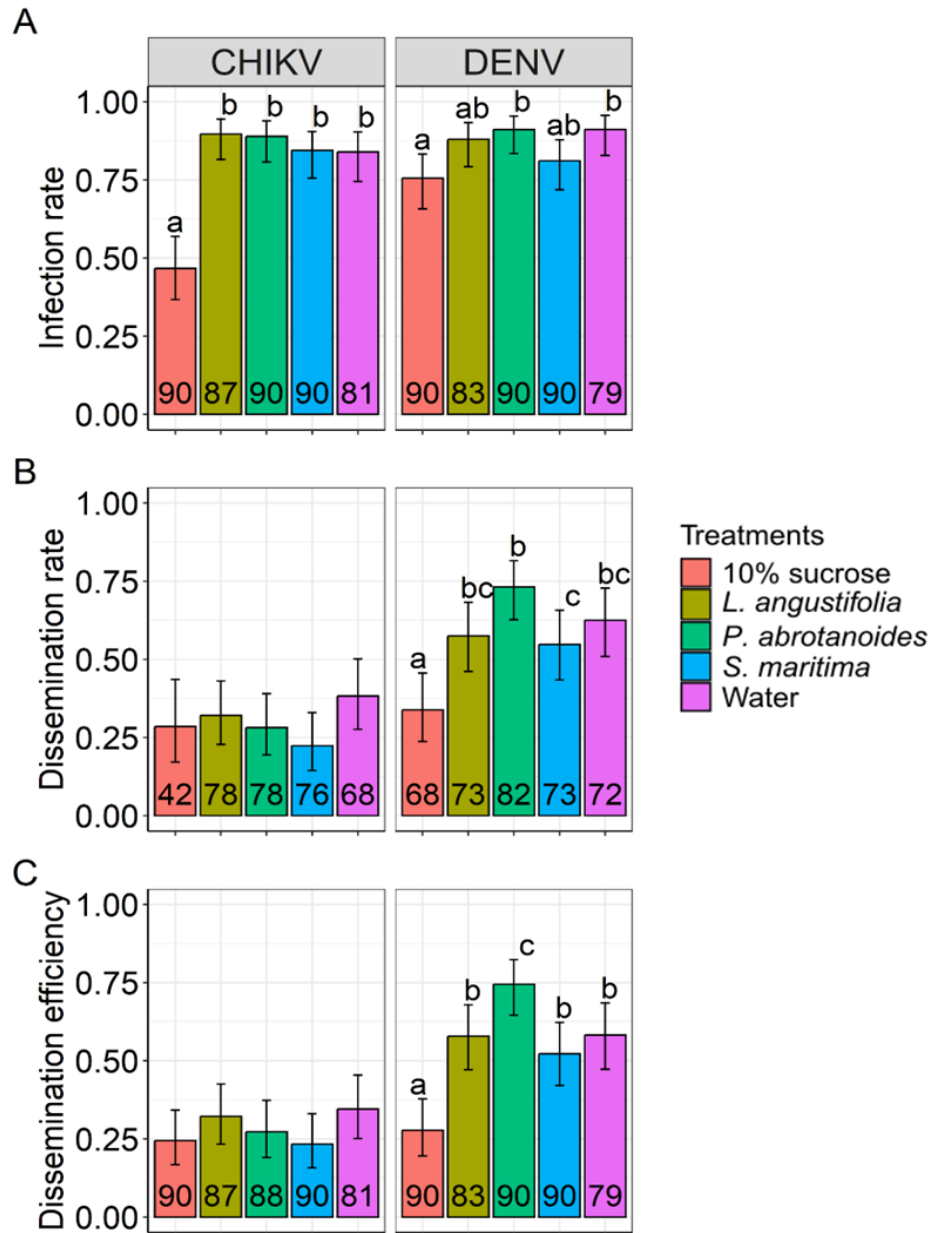


Figure 5. Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV infection and dissemination ($\pm$ 95% CI) in *Aedes albopictus* females at 7 dpi across three replicates. A) Infection rate is the proportion of mosquitoes displaying qPCR positive bodies out of the total number of tested females. B) Dissemination rate represents the proportion of mosquitoes displaying qPCR positive heads among the number of mosquitoes with qPCR positive bodies. C) Dissemination efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with qPCR positive heads among the total number of tested mosquitoes. Numbers displayed inside the bars are the total number of qPCR-tested bodies or heads. Different letters above the bars denote statistically significant differences based on multiple pairwise *post hoc* tests. The absence of letters in a panel indicates no significant main effect of treatment.

d. Influence of pre-infection diet treatment on mosquito infection, dissemination and transmission rate at 7 and 14 dpi across the first and third replicates

To examine the temporal dynamics of competence traits, we focused on replicates 1 and 3, where these traits were measured at both 7 and 14 dpi.

Overall, the IRs for CHIKV and DENV were similar at both 7 and 14 dpi, with values of 0.81 (243/300), 0.85 (256/300), 0.79 (224/284), and 0.79 (235/296), respectively (**Figure 6A**). In mosquitoes exposed to CHIKV, a significant interaction between treatment and time point was observed (LRT $\chi^2_4 = 60.19$; $p < 0.001$). Specifically, at 7 dpi, the 10% sucrose treatment reduced the IR by more than 52% compared to the other four treatments, whereas at 14 dpi, it increased the IR relative to the three plant treatments (**Figure 6A**). For mosquitoes exposed to DENV, a treatment-by-time point interaction was also identified (LRT $\chi^2_4 = 60.19$; $p < 0.001$), with the 10% sucrose, *L. angustifolia* and *P. abrotanoides* treatments reducing IR only at 14 dpi (**Figure 6A**). At 7dpi, the effect of treatment on DENV IR was marginally significant (LRT $\chi^2_4 = 9.97$; $p = 0.04$), however, after adjusting for multiple comparisons, no significant pairwise differences were observed (**Figure 6A**).

At 14 dpi, as observed at 7 dpi (Figure 5A), the DR for DENV was higher than for CHIKV (CHIKV: 0.61; 137/224 and DENV: 0.82; 193/235) (LRT $\chi^2_1 = 24.90$; $p = 6.03 \times 10^{-7}$) (**Figure 6B**). In mosquitoes exposed to CHIKV, just as at 7 dpi, there were no differences between the treatments at 14 dpi (LRT $\chi^2_4 = 3$; $p = 0.55$). For DENV, contrary to 7 dpi, there were no effects of treatments over the DRs at 14 dpi (LRT $\chi^2_4 = 5.6$; $p = 0.23$).

At 14 dpi, the difference between the two viruses DEs was lower but DENV still led to a biggest DE (CHIKV: 0.58; 164/284 and DENV: 0.71; 211/296; LRT $\chi^2_1 = 13.77$; $p = 0.0002$; **Figure 6C**). The results were similar to the DRs for CHIKV-infected mosquitoes. For DENV, the treatments had an effect on the DEs both at 7 dpi (LRT $\chi^2_4 = 21.4$; $p = 0.0003$) and at 14 dpi (LRT $\chi^2_4 = 10.54$; $p = 0.03$), contrary to the DRs (**Figure 6C**).

Detailed IR, DR and DE at 7 vs. 14 dpi for each of the two replicates are given in **Figure S9, S10, S11** respectively.

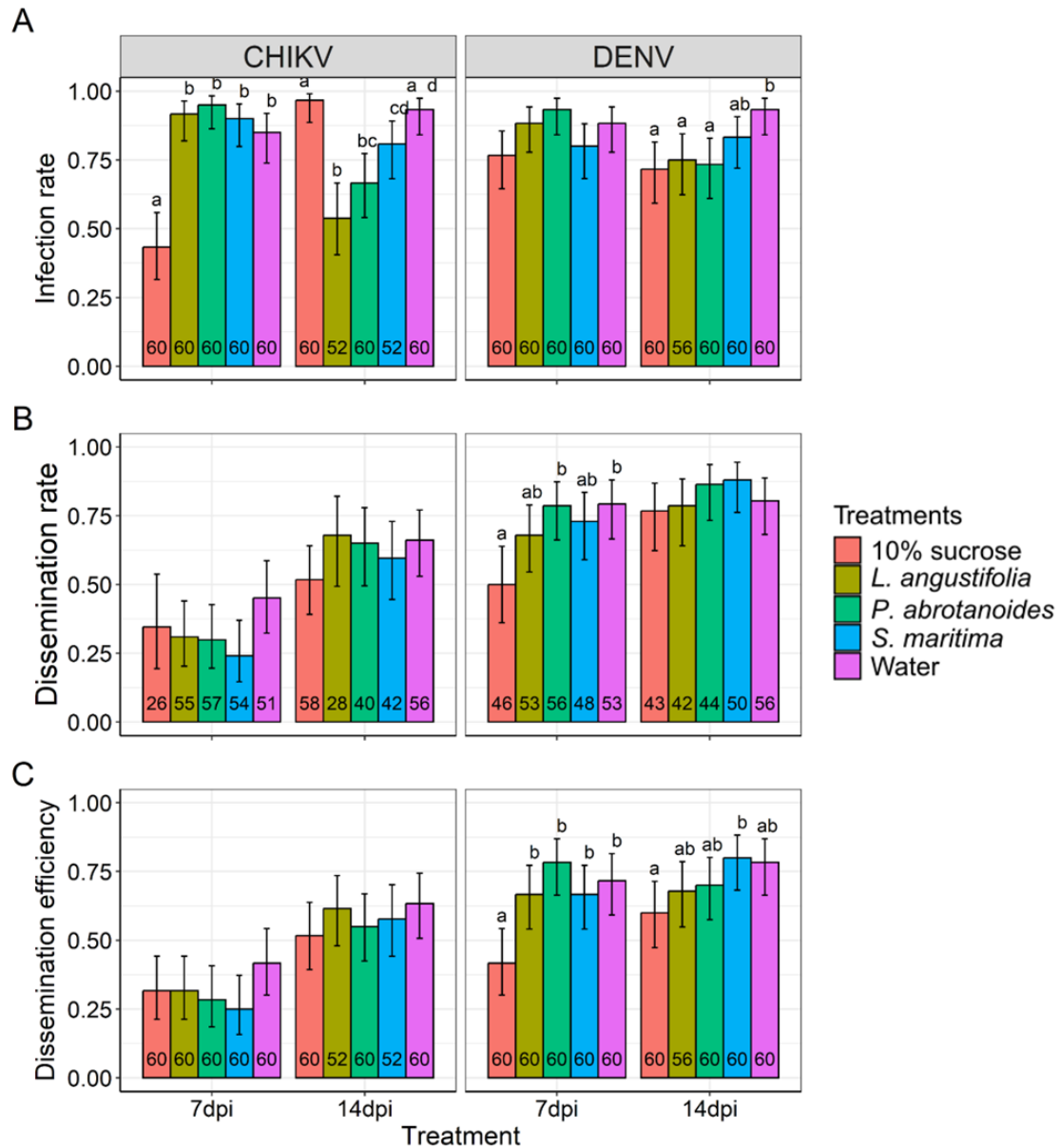


Figure 6. Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV infection and dissemination rates ($\pm$ 95% CI) at 7 and 14 dpi in *Aedes albopictus* females, across replicates 1 and 3. A) Infection rates are the proportions of mosquitoes testing positive by qPCR in their bodies at 7 days post-infectious blood meal (dpi). B) Dissemination rates are the proportions of mosquitoes testing positive through qPCR in their heads among the mosquitoes displaying qPCR positive bodies. C) Dissemination efficiency is the proportion of mosquitoes displaying a qPCR positive head among the tested. Numbers displayed inside the bars are the total number of qPCR-tested bodies or heads. Different letters above the bars denote statistically significant differences based on multiple pairwise *post hoc* tests. The absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment.

e. Influence of pre-infection diet treatment on mosquito transmission rate and viral load efficiency **at 7 dpi across the second and third replicates**

At 7 dpi, the TR was higher for CHIKV (25/85) than for DENV (2/161) (**Figure 7A**). There were no significant differences in TRs between the treatments. In terms of viral load, i.e. amount of infectious viral particles in salivas, there were significant differences between the treatments in mosquitoes infected by CHIKV (LRT $\chi^2_4 = 14.2$, $p = 0.007$) with 10% sucrose and *L. augustifolia* leading to the highest load and *P. abrotanoides* leading to the lowest. In DENV-infected mosquitoes, the treatment had no effect on the viral load but there was very few positive saliva as measured by titration for this time point (LRT $\chi^2_4 = 0.07$, $p = 0.99$; **Figure 7B**).

There were no TEs for CHIKV as only the individuals displaying a qPCR positive heads were submitted to the titration assay. For DENV, the TE was 0.018 (5/277) and there were no significant differences in the TE between the different treatments (LRT $\chi^2_4 = 6.39$, $p = 0.17$) (**Figure 7C**). In terms of intensity, there were also no differences between the treatments (LRT $\chi^2_4 = 4.79$, $p = 0.31$) (**Figure 7D**).

Detailed TR and TE at 7 dpi for replicate 2 and 3 are given in **Figure S12, S13** respectively.

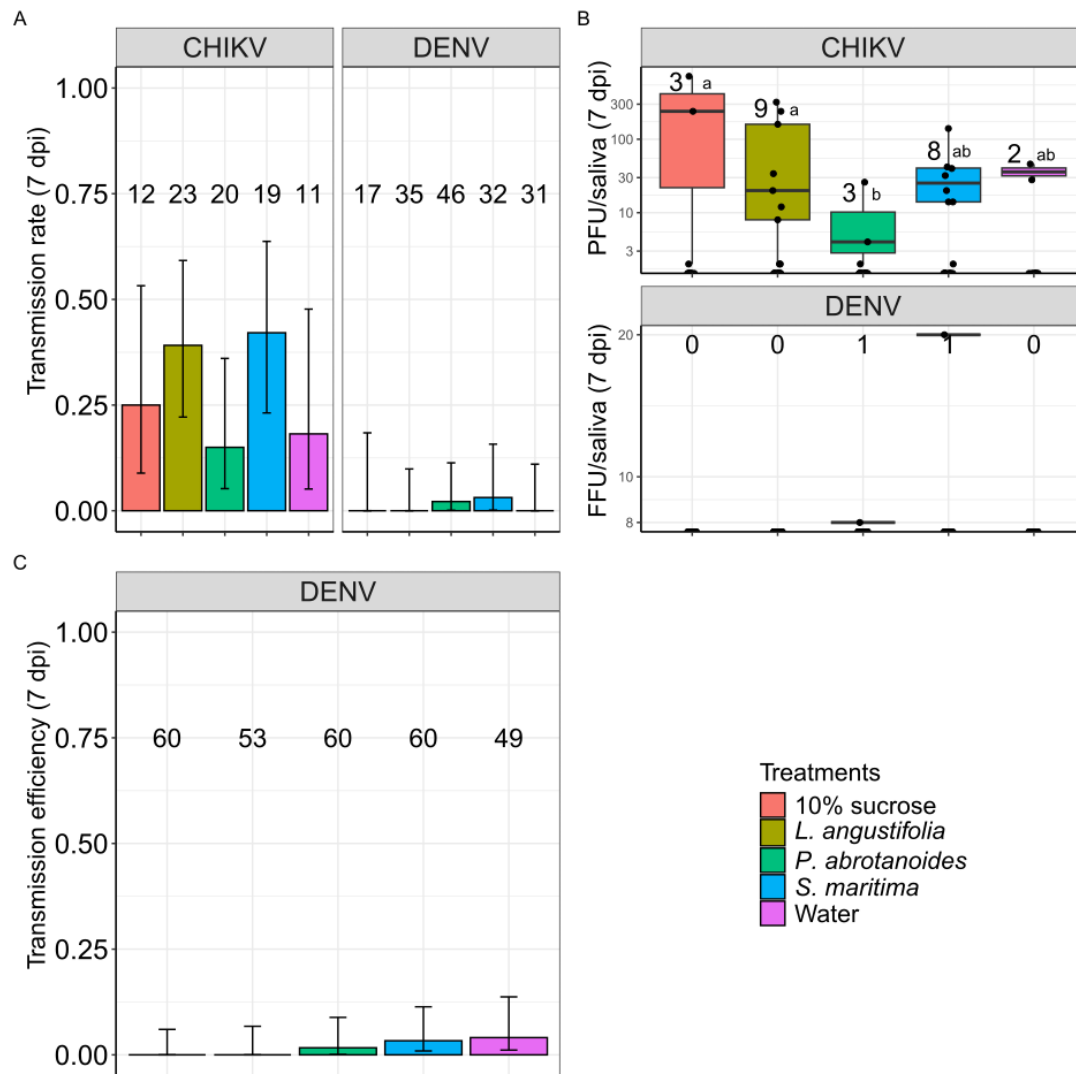


Figure 7. Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV transmission at 7 dpi in *Aedes albopictus* females, across replicates 2 and 3. A) Transmission rate is the proportion of mosquitoes tested positive by titration assay in their saliva among those displaying qPCR positive heads at 7 dpi. B) Transmission intensity corresponds to the amount of infectious particles in the saliva among mosquitoes displaying qPCR positive heads. C) Transmission efficiency is the proportion of mosquitoes tested positive by titration assay in their saliva among all tested individuals. Numbers above the bars indicate the total number of mosquitoes. Numbers above the boxes indicate the number of positive individuals. Different letters above the bars denote statistically significant differences based on multiple pairwise *post hoc* tests. Absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment. For CHIKV, there is no TE since only the individuals displaying qPCR positive heads were tested in the titration assay.

f. Influence of pre-infection diet treatment on mosquito transmission rate and efficiency at **14 dpi in the third replicate only**

At 14 dpi, there were no differences in the TR between the viruses (DENV: 0.22; 31/141; CHIKV: 0.15; 15/99; LRT $\chi^2_1 = 1.89$, $p = 0.17$; **Figure 8A**). There was no effect of treatment on the TRs of both viruses (CHIKV: LRT $\chi^2_4 = 3.45$, $p = 0.48$; DENV: LRT $\chi^2_4 = 1.93$, $p = 0.74$).

In terms of viral load, there were significant differences between the treatments in mosquitoes infected by DENV (LRT $\chi^2_4 = 17.1$, $p = 0.002$) but not by CHIKV (LRT $\chi^2_4 = 2.39$, $p = 0.67$; **Figure 8B**). In particular, mosquito feeding on *P. abrotanoides* decreased the amount of infectious viral particles compared to the other treatment. The TE of DENV was 0.21 (31/150) and there was no effect of treatment (LRT $\chi^2_4 = 1.37$, $p = 0.85$; **Figure 8C**). There were no TEs for CHIKV as only the individuals displaying a qPCR positive head were submitted to the titration assay. For DENV, . In terms of intensity, there were significant differences between the treatments (LRT $\chi^2_4 = 16.88$, $p = 0.002$) with *P. abrotanoides* leading to smaller intensity than the other treatments (**Figure 8D**).

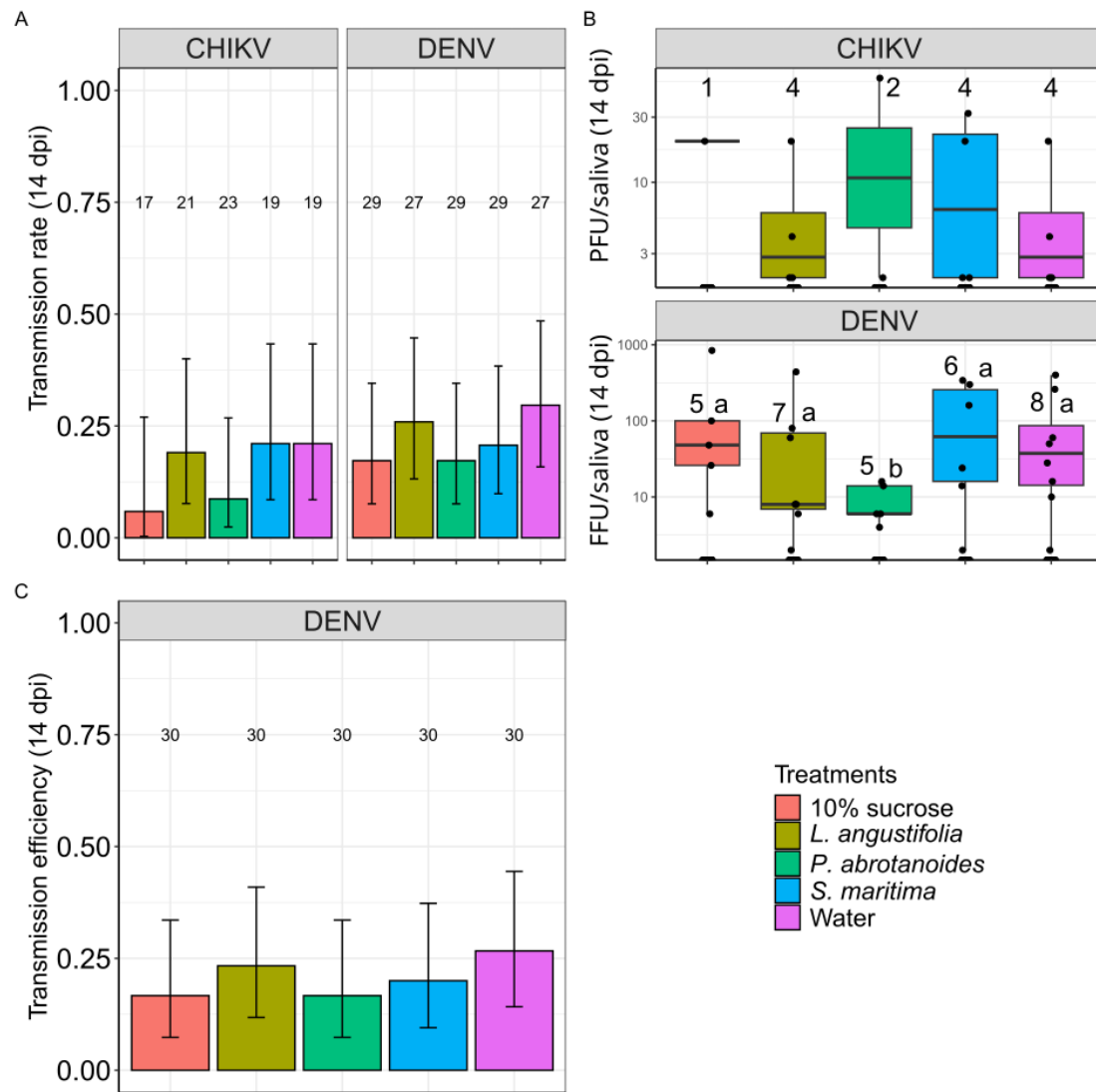


Figure 8: Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV transmission at 14 dpi in *Aedes albopictus* females, in the third replicate. A) Transmission rate is the proportion of mosquitoes tested positive by titration assay in their saliva among those displaying qPCR positive heads at 14 dpi. B) Viral loads correspond to the amount of infectious particles in the saliva among mosquitoes displaying qPCR positive heads. C) Transmission efficiency is the proportion of mosquitoes tested positive by titration assay in their saliva among all tested individuals. D) Transmission efficiency intensity is the amount of infectious particles among all tested individuals. Numbers above the bars indicate the total number of mosquitoes. Numbers above the boxes indicate the number of positive individuals. Different letters above the bars denote statistically significant differences based on multiple pairwise *post hoc* tests. *Absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment.* For CHIKV, there is no TE since only the individuals displaying qPCR positive heads were tested in the titration assay.

2) Influence of Microbiota on Infection rate

Results are still in acquisition.

3) Mosquito survival from 1 to 14 days post-infection

After the infectious blood meal, all the mosquitoes were maintained on 10% sucrose solution and were not reassigned to their initial treatment. The post-infection survival rate of mosquitoes varied significantly among the different treatments. Specifically, *P. abrotanoides*, *S. maritima*, and water decreased survival compared to 10% sucrose (LRT $\chi^2_4 = 13.3$; $p = 0.01$; **Figure 9**). No significant interaction between treatment and virus was detected (LRT $\chi^2_4 = 3.43$, $p = 0.49$). The survival rate of mosquitoes infected with CHIKV was lower than that of DENV-infected mosquitoes (LRT $\chi^2_1 = 14.2$; $p = 0.0001$). However, when analyzing each virus separately, the effect of the treatment was no longer significant (CHIKV: LRT $\chi^2_4 = 9.16$; $p = 0.057$ and DENV: LRT $\chi^2_4 = 6.64$; $p = 0.16$).

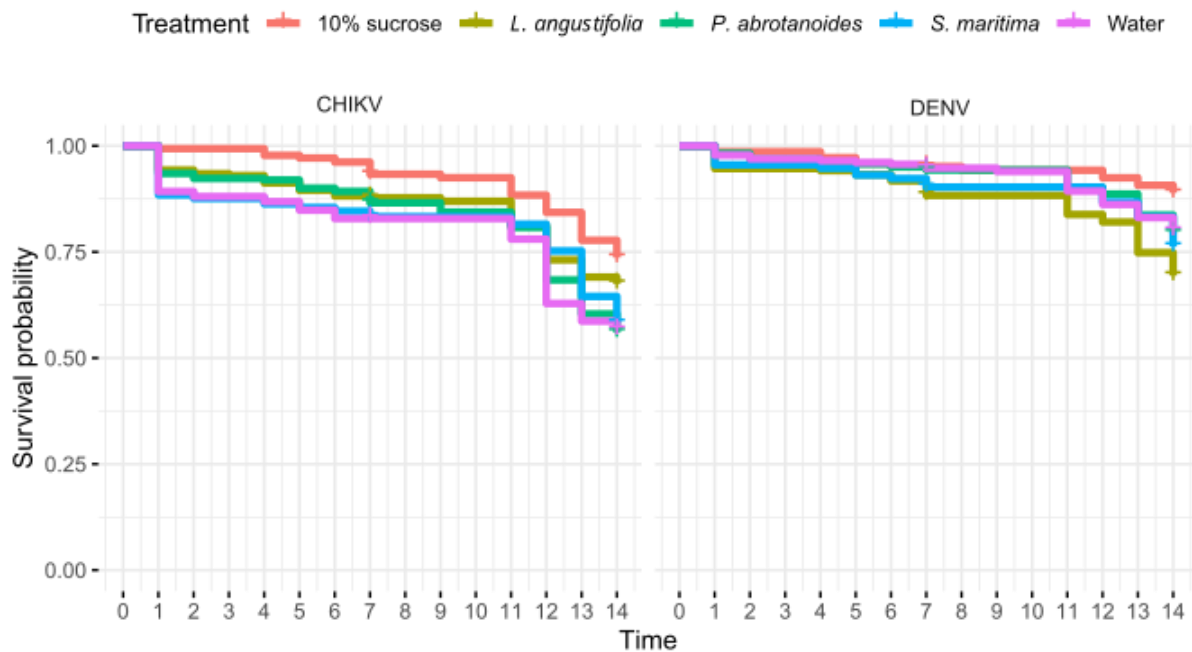


Figure 9. The effect of 3 plant species, water and a 10% sucrose control solution on the survival of *Aedes albopictus* from 1 to 14 days post-infection with either chikungunya or dengue virus.

Kaplan-Meier curves represent the proportion of surviving mosquitoes over time for each treatment.

IV- Discussion

Feeding on different sources of natural plant-derived sugars can influence key traits of *Ae. albopictus* vector competence for CHIKV and DENV. This could have important epidemiological consequences, especially with the arboviral infections becoming more and more important each year resulting in a major public health issue.

As repeatedly shown previously, females survived longer than males (Cui *et al.* 2021). The different treatments significantly modified the longevity of both males and females *Ae. albopictus* individuals with 10% sucrose and *P. abrotanoides* leading to the best survival and water to the lowest. Those results can be linked to the results of the cold anthrone test which showed differences in the fructose positivity between the different diets. Again, 10% sucrose and *P. abrotanoides* led to the biggest proportion of fructose positivity and water and *L. angustifolia* led to the lowest. For water, the result was anticipated, but the outcome for *L. angustifolia* was unexpected. *Lavandula*, typically known for its nectar-rich flowers used in honey production, has a high content of glucose, fructose, and particularly sucrose (Crane and Walker 1984). These results can be attributed to the fact that the survival and cold-anthrone assays were conducted at the end of the blooming season, resulting in withered flowers likely deficient in nectar content. Consequently, the lower sugar availability in *Lavandula* may have led to poor survival due to insufficient nutrient intake. Furthermore, a marked decrease in survival was observed after six days across all treatments. This suggests a potential issue with the climatic chamber, as a similar decline was noted even in the 10% sucrose treatment, which is typically associated with high survival rates. Taken together, repeating this survival experiment would strengthen the robustness of the results regarding the effect of natural sugar source on *Ae. albopictus* longevity. Additionally, coupling this survival experiment with nectar quantification, such as the degrees Brix analysis (Paré *et al.* 2023), would provide valuable insights. As part of this second replicate to come, the anthrone test should also be repeated, as we obviously had contamination with mosquitoes that tested positive for fructose in one of the two cages from the water-only treatment. For that experiment, we shared the climatic chamber with other experimenters, and we think that sweet sucrose solution flowed from one of their cages into one of negative control cage, especially since only one cage contained fructose-positive individuals and it was below those cages. As expected and repeatedly shown, there was a bigger proportion of fructose-positive males than females. Males are strict phytophagous leading to the fact that they are more often found positive

to the cold-anthrone test (Harada *et al.* 1975; Müller *et al.* 2011; Bellini *et al.* 2014; Fikrig *et al.* 2020; Swan *et al.* 2021). Overall, the fructose-positivity rates were good (15-45% for females) and comparable to those previously observed (Swan *et al.* 2021). Importantly, this also indicates that, on the day of infection, mosquitoes exposed to the blood meal had previously consumed at least one sugar meal.

The sugar treatment received before the blood meal influenced both the blood feeding rate and the subsequent blood meal size. *P. abrotanoides* led to the highest blood feeding rate for both CHIKV and DENV. Notably, only the 10% sucrose solution resulted in a reduced blood meal size in mosquitoes infected with both viruses. However, after adjusting for multiple comparisons, this reduction remained significant only for DENV. That effect of the 10% sucrose was somewhat expected. In *Anopheles gambiae* females for example, it has been shown that they take larger blood meals when deprived of sugar meals to compensate for the lack of nutrients thereby, completing their egg maturation and achieving their fitness potential (Fernandes and Briegel 2005; Barredo and DeGennaro 2020). Sugar meals are known as blood feeding suppressants because they cause satiation and reduce the abdominal space available for subsequent blood meals (Foster 1995; Gary and Foster 2001; Braks *et al.* 2006; Fikrig *et al.* 2020). Consequently, this creates a trade-off in transmission potential between blood and sugar feeding. Water indeed contains no sugar and these results would indicate that the three plant species chosen are lower in sugar content than a 10% sucrose solution.

After the blood meal, once the virus is inside the midgut, it replicates within the epithelial cells allowing us to quantify the IR. In the case of CHIKV-exposed mosquitoes, 10% sucrose solution reduced the IR at 7dpi compared to the three plant treatments and water. However, at 14 dpi, 10% sucrose displayed the highest IR compared to the three plant treatments. This means that the different treatments seem to have a role in the viral dynamic inside the mosquitoes gut. Although the 10% sucrose decreases the IR of CHIK-infected mosquitoes, it does not lead to midgut dissemination barrier since there are no differences between the treatments in the DE. Regarding the TRs, they are all high after 7 dpi, which aligns with expectations since the virus is presumed to have reached the salivary glands by 2 dpi (Dubrulle *et al.* 2009). When examining transmission intensity, *P. abrotanoides* resulted in the lowest, and the 10% sucrose solution in the highest intensity. At 14 dpi, there were no differences in TR or transmission intensity between the treatments. However, caution is warranted when interpreting these results for CHIKV, as 7 and 14 dpi are considered late timepoints for CHIKV dynamics in mosquitoes. Indeed, the virus can reach the salivary glands as early as 48 hours post-infection (Dubrulle *et al.* 2009). In the future, it would be interesting for CHIKV to add earlier time points such as 2, 4 and 6 dpi (Viginier *et al.* 2023).

For DENV-infected mosquitoes, the 10% sucrose also led to the lowest IR. Water and *P. abrotanoides* led to the highest IR at 7dpi. By 14dpi, the 10% sucrose, *L. angustifolia* and *P. abrotanoides* resulted in the lowest IR, while water led to the highest. When looking at DEs, the 10% sucrose solution led to the lowest at 7 and 14 dpi. *P. abrotanoides* led to the highest DE at 7 dpi. Regarding TRs, they were low at 7 dpi, which was expected as this time point is relatively early in the DENV dynamics (Salazar *et al.* 2007). At 14 dpi, there were no significant differences in TR between the diets. However, when examining transmission intensity, *P. abrotanoides* also resulted in the lowest intensity.

These findings suggest that diet could influence viral dynamics and its extrinsic incubation period within the mosquito's gut. Although sugar meals are stored in the crop and blood meals in the midgut, the two types of meal can mix in the gut, when sugar meals are metabolized. This may lead to an effect of the diet on the overall viral infection process. This effect might come from multiple mechanisms.

Firstly, the effect of the diet can be direct, negatively affecting the virus development through secondary metabolites. Indeed, the plants that we chose are rich in those. For example, *L. angustifolia* is rich in monoterpenes (Gonçalves and Romano 2013), *P. abrotanoides* in phenolic compounds, flavonoids, and anthocyanins (all having antioxidants activities) (Alamdari 2021), and *S. maritima* in phenolic compounds (tannins) (Jalloul *et al.* 2022). All those secondary metabolites are involved in the plant defense against herbivores and can be toxic. They are found in all plant tissues including floral nectars, roots, and leaves.

Secondly, the diet can enhance or reduce infection by modulating the amount of resources available for the virus. Indeed, a poor quality sugar source may provide less energy to the virus and hence limits its infection. Plant nectars are dominated by 3 simple sugars: sucrose, fructose and glucose (Slavković and Bendahmane 2023). Multiple other nectar sugars include arabinose, galactose, mannose, allose, gentiobiose, lactose, maltose, melibiose, trehalose, melezitose, raffinose and stachyose. *L. angustifolia* flowers are rich in nectar which has a medium content in glucose and fructose but is rich in sucrose (Crane and Walker 1984). *S. maritima* nectar is rich in fructose and glucose and poor in sucrose (Petanidou *et al.* 2006) but the amount of nectar per flower is poor (Bosch *et al.* 1997). According to this scenario, some plant species could not provide enough sugar to the mosquito host for virus replication (Yan *et al.* 2023).

Thirdly, the plant effect might be indirect through effects on the host physiology and immune system and/or microbiota. Indeed, compared to *ad libitum* 10% sucrose solution, feeding on natural plant nectar (in limited amounts in a cage) can lead to lower energy allocated to the immune response (Yan *et al.* 2023). Hence, a rich nutrition will lead to a better immune response. This has been shown in *C. pipiens* for example where the melanization response, an immune

pathway, is reduced when individuals are maintained on 2% versus 20% sucrose (Ferguson *et al.* 2019). In *Ae. aegypti*, sugar feeding increases and maintains antiviral immunity in the digestive tract, which protects the mosquito against arboviral infections (Almire *et al.* 2021). Similarly, the diet and nutritional status of mosquitoes can also have profound effects on their microbiota (David *et al.* 2016). The microbiota can, in turn, act directly on the pathogen (Joyce *et al.* 2011; Dennison *et al.* 2014) or indirectly by stimulating the immune system (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009).

Finally, another possible mechanism is the blood meal size. Indeed, for DENV, the mosquitoes fed on 10% sucrose took smaller blood meals. For CHIKV, it was also the case, but that effect did not remain significant after adjusting for multiple tests. Concomitantly, in both viruses, 10% sucrose led to the lowest IR at 7dpi. Those lower IR may be attributed to the blood meal size taken by mosquitoes. Indeed, it has been shown in an experimental setting testing multiple infectious doses, that a lower viral infectious dose can result in a smaller IR (Ledermann *et al.* 2017). This effect may be driven by the fact that smaller blood meals lead to a smaller viral inoculum. In our experiment, mosquito abdomens were photographed to estimate blood meal sizes before pooling them together in cups for incubation. At 7 and 14 dpi, mosquitoes were randomly sampled from these cups to measure competence parameters. Since mosquitoes were not kept individually, we cannot directly correlate blood meal size with competence measures at the individual level. However, we assessed the relationship between the average blood meal size and infection levels at the cup level. Although we observed a positive trend between the blood meal size and the IR at the cup level, the correlation was not statistically significant (**Figure S12**). Plus, that analysis compared two competence traits that have different effective sizes because there are much more individuals for the blood-meal size measurement than for the proportion of infected mosquitoes (as only a subset of individuals per treatment were tested in qPCR). Additional analysis is needed to examine whether similar trends exist for the other competence parameters (DR, TR, viral load). More importantly, repeating this experiment with individually housed mosquitoes will allow a precise analysis of the relationship between individual blood meal size and vector competence, potentially uncovering links that are obscured when only cup-level data are available.

It is important to keep in mind that in this experiment, mosquitoes were not returned to their initial diet post-infection. Thus, the plant-mediated effects observed at 7- or 14-days result from prior meals with potentially lasting impacts on viral dynamics. Repeating the experiment with mosquitoes re-exposed to their treatment diet post-infection (i.e., treatment both before and after infection) could amplify the observed effects on competence. Additionally, a complementary experiment in which all mosquitoes are maintained on 10% sucrose before infection, and then

assigned to treatment afterward, would help isolate and assess the curative effect alone. Similarly, when analysing the post-infection survival rate of mosquitoes for each virus, no significant differences were observed between the treatments. This was somehow expected as the mosquitoes were not reassigned to their initial treatment but were instead all maintained on 10% sucrose *ad libitum*. Consequently, it is not surprising that the differences in survival rates among the treatments tended to decrease.

Moreover, the qPCR on the bodies and heads from the first and second replicates must be repeated in the same conditions as the third one. Meaning that, they have to be done again but in 384 well plates, with a quantification done with a standard curve. With those results, we will be able to compare the qPCR Ct values (proxy of the amount of viral RNA) among the treatments. The use of quantification via a standard curve might slightly modify the positivity rate for some individuals which were having high Ct. It might also correct for the few individuals displaying a qPCR negative body with a qPCR positive head. Plus, the whole experiment should be repeated at least once, to obtain more results on the transmission part.

The significant reduction in infection levels from IR or DR to TR, regardless of treatment, may result from differences in detection methods: qPCR identifies viral RNA, while titration measures active, infectious virus (Dhakal *et al.* 2021). Thus, while the virus may reach the head, it could be neutralized by the immune system before becoming transmissible. Additionally, technical challenges during the salivation assay, which requires positioning the proboscis in a 20 μ L pipette tip, could also contribute to lower TR measurements.

To delve deeper into the potential involved mechanisms, we should characterize the composition of the chosen plants' nectar using techniques such as gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) (Upshur *et al.* 2023). This analysis could help identify potential antiviral or immune-stimulating compounds present in the nectar.

In nature, plant phenology is really inconsistent since it depends on multiple environmental factors such as temperature (Cleland *et al.* 2007; Chuine 2010), photoperiod (Flynn and Wolkovich 2018), nutrient and water availability (Liu *et al.* 2016; Hufkens *et al.* 2016). Plus, nectar availability from bouquets from the field is inconsistent. Indeed, the amount of nectar per flower bouquet can vary significantly, as plants are naturally exposed to a whole community of nectar-feeding animals. Consequently, in our experiments, nectar abundance could have fluctuated depending on the collection period (due to plant phenology) and on the number of consumers which fed on it, depleting its nectar. Two solutions for future studies would be to work with greenhouses plants and putting whole plants inside mosquitoes cages, which might help

standardize the protocols; or to put mesh bags around the wildflowers, to protect them from nectar depletion by other nectar-feeding animals.

Under natural conditions, mosquitoes can feed on different plants, depending on their preferences and on plant availability, which can modulate the vector competence depending on the proportion of consumption of each plant. Our experimental design did not allow mosquitoes to choose between the different plants. Future experiments allowing the mosquitoes the ability to self-select from multiple options as in a cafeteria design would be valuable. Similarly, complementing this experiment with pairwise preference assays using dual-port olfactometers could reveal whether mosquitoes selectively choose plant species that enhance their longevity and fecundity, or optimize resistance / tolerance to virus (self-medication hypothesis). Alternatively, it could reveal whether infected mosquitoes are drawn to plant species that support pathogen development while compromising mosquito fitness (parasite manipulation hypothesis).

Finally, using eggs from field-captured females rather than a lab-established colony, whose behavior and life history traits may differ from that observed in the wild, would be an interesting approach. Moreover, *Aedes* mosquitoes are relatively easy to colonize compared to other mosquito species as they accept a high density of adults in cages. However, this could present a limitation during the blood feeding step, as field strains may not be accustomed to feeding on artificial blood feeders (Rose *et al.* 2024).

V- References

- Alamdari EG. 2021. GC-MS analysis of the essential oil composition and antioxidant activity of *Perovskia abrotanoides* Kar. from different growth stages. *Indian J Nat Prod Resour IJNPR Former Nat Prod Radiance* 12: 230–7.
- Almire F, Terhzaz S, Terry S, et al. 2021. Sugar feeding protects against arboviral infection by enhancing gut immunity in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 17: e1009870.
- Barredo E and DeGennaro M. 2020. Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. *Trends Parasitol* 36: 473–84.
- Bellini R, Puggioli A, Balestrino F, et al. 2014. Sugar administration to newly emerged *Aedes albopictus* males increases their survival probability and mating performance. *Acta Trop* 132: S116–23.
- Bosch J, Retana J, and Cerdá X. 1997. Flowering phenology, floral traits and pollinator composition in a herbaceous Mediterranean plant community. *Oecologia* 109: 583–91.
- Braks M a. H, Juliano SA, and Lounibos LP. 2006. Superior reproductive success on human blood without sugar is not limited to highly anthropophilic mosquito species. *Med Vet Entomol* 20: 53–9.
- Briegel H, Lea AO, and Klowden MJ. 1979. Hemoglobinometry as a Method for Measuring Blood Meal Sizes of Mosquitoes (Diptera: Culicidae)1. *J Med Entomol* 15: 235–8.

Chuine I. 2010. Why does phenology drive species distribution? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365: 3149.

Cleland EE, Chuine I, Menzel A, et al. 2007. Shifting plant phenology in response to global change. *Trends Ecol Evol* 22: 357–65.

Crane E and Walker P. 1984. Composition of Honeys from Some Important Honey Sources. *Bee World*.

Cui G, Zhong S, Zheng T, et al. 2021. *Aedes albopictus* life table: environment, food, and age dependence survivorship and reproduction in a tropical area. *Parasit Vectors* 14: 568.

David MR, Santos LMB dos, Vicente ACP, and Maciel-de-Freitas R. 2016. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111: 577–87.

Dennison NJ, Jupatanakul N, and Dimopoulos G. 2014. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci* 3: 6–13.

Dhakal J, Jia M, Joyce JD, et al. 2021. Survival of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) on Foods Stored at Refrigerated Temperature. *Foods Basel Switz* 10: 1005.

Dong Y, Manfredini F, and Dimopoulos G. 2009. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. *PLOS Pathog* 5: e1000423.

Dorie V, functions) DB (lme4 non-modular, functions) MM (lme4 non-modular, et al. 2024. *blme: Bayesian Linear Mixed-Effects Models*.

Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, et al. 2009. Chikungunya Virus and *Aedes* Mosquitoes: Saliva Is Infectious as soon as Two Days after Oral Infection. *PLOS ONE* 4: e5895.

Ferguson LV, Beckett NH, French M-C, et al. 2019. Sugar intake interacts with temperature to influence reproduction and immunity in adult *Culex pipiens* mosquitoes. *Can J Zool* 97: 424–8.

Ferguson HM and Read AF. 2002. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc R Soc B Biol Sci* 269: 1217.

Fernandes L and Briegel H. 2005. Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol* 30: 11–26.

Fikrig K, Peck S, Deckerman P, et al. 2020. Sugar feeding patterns of New York *Aedes albopictus* mosquitoes are affected by saturation deficit, flowers, and host seeking. *PLoS Negl Trop Dis* 14: e0008244.

Flynn DFB and Wolkovich EM. 2018. Temperature and photoperiod drive spring phenology across all species in a temperate forest community. *New Phytol* 219: 1353–62.

Fontaine A, Jiolle D, Moltini-Conclois I, et al. 2016. Excretion of dengue virus RNA by *Aedes aegypti* allows non-destructive monitoring of viral dissemination in individual mosquitoes. *Sci Rep* 6: 24885.

Foster WA. 1995. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. *Annu Rev Entomol* 40: 443–74.

Foster W a. 2022. Chapter 7: Behavioural ecology of plant-mosquito relations. *Sensory ecology of disease vectors*. Wageningen Academic Publishers.

Fox J, Weisberg S, Price B, et al. 2024. *car: Companion to Applied Regression*.

- Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, and Clem RJ. 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 7: 3741–67.
- Gadia CLB, Manirakiza A, Tekpa G, et al. 2017. Identification of pathogens for differential diagnosis of fever with jaundice in the Central African Republic: a retrospective assessment, 2008–2010. *BMC Infect Dis* 17: 1–5.
- Gary RE Jr and Foster WA. 2001. Effects of Available Sugar on the Reproductive Fitness and Vectorial Capacity of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 38: 22–8.
- Gonçalves S and Romano A. 2013. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 31: 166–74.
- Harada F, Moriya K, and Yabe T. 1975. Observations on the survival and longevity of *Culex* and *Aedes* mosquitoes fed on the flowers of nectar plants (IV). *Med Entomol Zool* 26: 193–201.
- Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, and Reeves WC. 1983. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. *Annu Rev Entomol* 28: 229–62.
- Hien DFDS, Dabiré KR, Roche B, et al. 2016. Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria. *PLoS Pathog* 12: e1005773.
- Hufkens K, Keenan TF, Flanagan LB, et al. 2016. Productivity of North American grasslands is increased under future climate scenarios despite rising aridity. *Nat Clim Change* 6: 710–4.
- Jalloul A ben, Chaar H, Tounsi MS, and Abderrabba M. 2022. Variations in phenolic composition and antioxidant activities of *Scabiosa maritima* (*Scabiosa atropurpurea* sub. *maritima* L.) crude extracts and fractions according to growth stage and plant part. *South Afr J Bot* 146: 703–14.
- Jiolle D, Moltini-Conclois I, Obame-Nkoghe J, et al. 2021. Experimental infections with Zika virus strains reveal high vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* populations from Gabon (Central Africa) for the African virus lineage. *Emerg Microbes Infect* 10: 1244–53.
- Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, et al. 2011. Interactions Between La Crosse Virus and Bacteria Isolated From the Digestive Tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 48: 389–94.
- Kramer LD and Ciota AT. 2015. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol* 15: 112–8.
- Lambrechts L, Chavatte J-M, Snounou G, and Koella JC. 2006. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc R Soc B Biol Sci* 273: 1501.
- Ledermann JP, Borland EM, and Powers AM. 2017. Minimum infectious dose for chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. *Rev Panam Salud Pública* 41: e65.
- Lefèvre T, Oliver L, Hunter MD, and De Roode JC. 2010. Evidence for trans-generational medication in nature. *Ecol Lett* 13: 1485–93.
- Lenth RV, Banfai B, Bolker B, et al. 2024. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
- Lewis J, Gallichotte EN, Randall J, et al. 2023. Intrinsic factors driving mosquito vector competence and viral evolution: a review. *Front Cell Infect Microbiol* 13: 1330600.
- Liu Q, Fu YH, Zeng Z, et al. 2016. Temperature, precipitation, and insolation effects on autumn vegetation phenology in temperate China. *Glob Change Biol* 22: 644–55.

- Mayoral-Peña Z, Álvarez-Martínez R, Fornoni J, and Garrido E. 2020. The Extended Microbiota: How Microbes Shape Plant-Insect Interactions. In: Núñez-Farfán J, Valverde PL (Eds). Evolutionary Ecology of Plant-Herbivore Interaction. Cham: Springer International Publishing.
- Mizushima D, Yamamoto DS, Tabbabi A, et al. 2023. A rare sugar, allose, inhibits the development of Plasmodium parasites in the Anopheles mosquito independently of midgut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 13.
- Mogren CL and Shikano I. 2021. Microbiota, pathogens, and parasites as mediators of tritrophic interactions between insect herbivores, plants, and pollinators. *J Invertebr Pathol* 186: 107589.
- Müller GC, Xue R-D, and Schlein Y. 2011. Differential attraction of Aedes albopictus in the field to flowers, fruits and honeydew. *Acta Trop* 118: 45–9.
- Nicolson SW. 2022. Sweet solutions: nectar chemistry and quality. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 377: 20210163.
- Palmer-Young EC, Farrell IW, Adler LS, et al. 2019. Chemistry of floral rewards: intra- and interspecific variability of nectar and pollen secondary metabolites across taxa. *Ecol Monogr* 89: e01335.
- Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, et al. 2005. Development of a TaqMan® RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J Virol Methods* 124: 65–71.
- Petanidou T, Van Laere A, N. Ellis W, and Smets E. 2006. What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos* 115: 155–69.
- Ponton F, Wilson K, Cotter SC, et al. 2011. Nutritional Immunology: A Multi-Dimensional Approach. *PLoS Pathog* 7: e1002223.
- R Core Team. 2023. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rose NH, Shepard JJ, and Ayala D. 2024. Establishing Colonies from Field-Collected Mosquitoes: Special Accommodations for Wild Strains. *Cold Spring Harb Protoc* 2024: pdb.top107654.
- Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, et al. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes. *BMC Microbiol* 7: 9.
- Shikano I. 2017. Evolutionary Ecology of Multitrophic Interactions between Plants, Insect Herbivores and Entomopathogens. *J Chem Ecol* 43.
- Slavković F and Bendahmane A. 2023. Floral Phytochemistry: Impact of Volatile Organic Compounds and Nectar Secondary Metabolites on Pollinator Behavior and Health. *Chem Biodivers* 20: e202201139.
- Stone CM and Foster WA. 2013. Plant-sugar feeding and vectorial capacity. In: Takken W, Koenraadt CJM (Eds). Ecology of parasite-vector interactions. Wageningen: Academic Publishers.
- Swan T, Ritmejerdytė E, Sebayang B, et al. 2021. Sugar prevalence in Aedes albopictus differs by habitat, sex and time of day on Masig Island, Torres Strait, Australia. *Parasit Vectors* 14: 520.
- Therneau TM. 2024. coxme: Mixed Effects Cox Models.
- Thirion L, Pezzi L, Corcostegui I, et al. 2019. Development and Evaluation of a Duo Chikungunya Virus Real-Time RT-PCR Assay Targeting Two Regions within the Genome. *Viruses* 11: 755.

- Trouche B, Schrieke H, Duron O, et al. 2024. Wolbachia populations across organs of individual *Culex pipiens*: highly conserved intra-individual core pangenome with inter-individual polymorphisms. ISME Commun 4: ycae078.
- Upshur IF, Fehlman M, Parikh V, et al. 2023. Sugar feeding by invasive mosquito species on ornamental and wild plants. Sci Rep 13: 22121.
- Van Handel E. 1967. Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. Anal Biochem 19: 193–4.
- Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, et al. 2007. Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus*. PLOS ONE 2: e1168.
- Viginier B, Cappuccio L, Garnier C, et al. 2023. Chikungunya intra-vector dynamics in *Aedes albopictus* from Lyon (France) upon exposure to a human viremia-like dose range reveals vector barrier's permissiveness and supports local epidemic potential. Peer Community J 3: e96.
- Viglietta M, Bellone R, Blisnick AA, and Failloux A-B. 2021. Vector Specificity of Arbovirus Transmission. Front Microbiol 12.
- Xi Z, Ramirez JL, and Dimopoulos G. 2008. The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. PLOS Pathog 4: e1000098.
- Xiang BWW, Saron WAA, Stewart JC, et al. 2022. Dengue virus infection modifies mosquito blood-feeding behavior to increase transmission to the host. Proc Natl Acad Sci U S A 119: e2117589119.
- Yan J, Kim C-H, Chesser L, et al. 2023. Nutritional stress compromises mosquito fitness and antiviral immunity, while enhancing dengue virus infection susceptibility. Commun Biol 6: 1123.

Supplementary Information for:

Natural plant sugars modulate *Aedes albopictus* survival, blood-feeding, and competence for dengue and chikungunya viruses

Mathilde Jaquet ; Davy Jiolle ; Théo Mouillaud ; Isabelle Conclois ; Eve Toulza ; Olivier Rey ; Benjamin Gourbal ; Christophe Paupy ; Thierry Lefevre

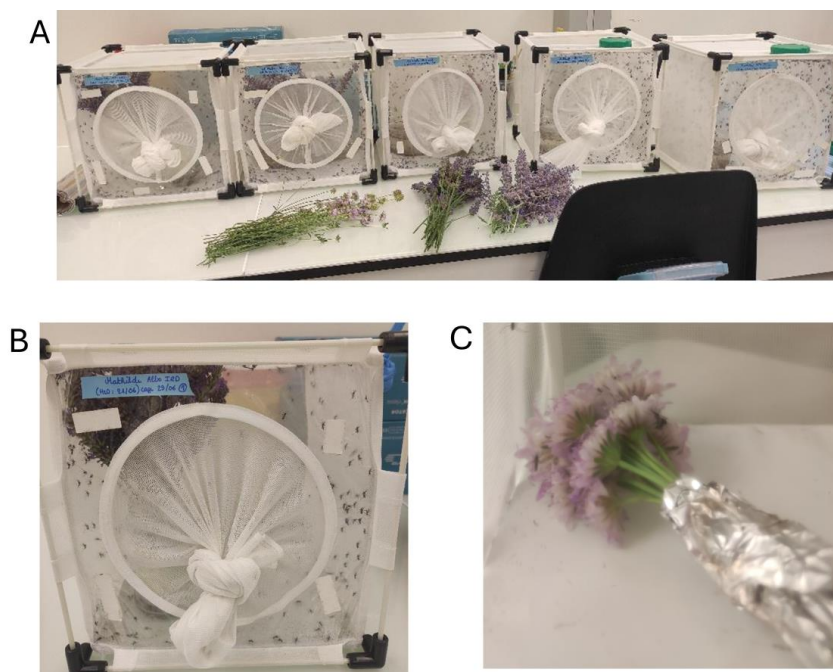


Figure S1. Photographies of (A, B) the cages containing the emergent mosquitoes and the bouquets. (C) The *Scabiosa maritima* bouquet wrapped in moistened paper towels and an aluminium sheet.

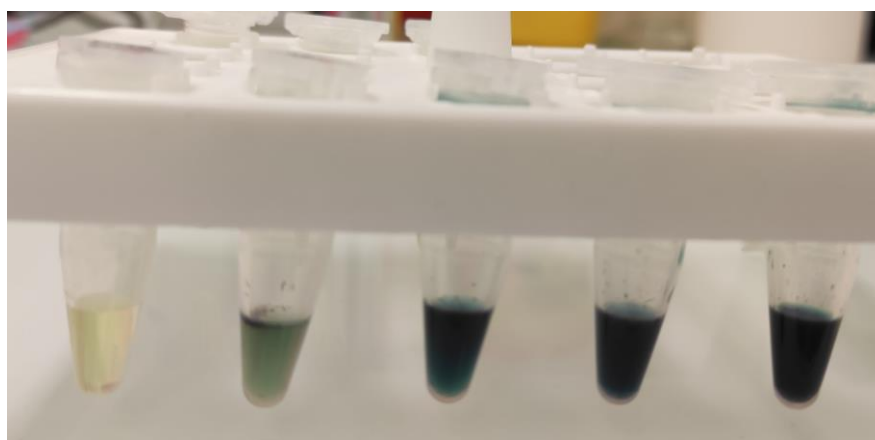


Figure S2. The anthrone test was performed in 1.5 mL Eppendorf tubes. The first tube on the left displays a negative reaction (control), while the remaining four tubes display a positive reaction, ranked from 1 (2nd tube) to 4 (5th tube on the extreme right).



Figure S3: Example of a picture captured with a DinoLite microscope to evaluate the blood meal size of mosquitoes.

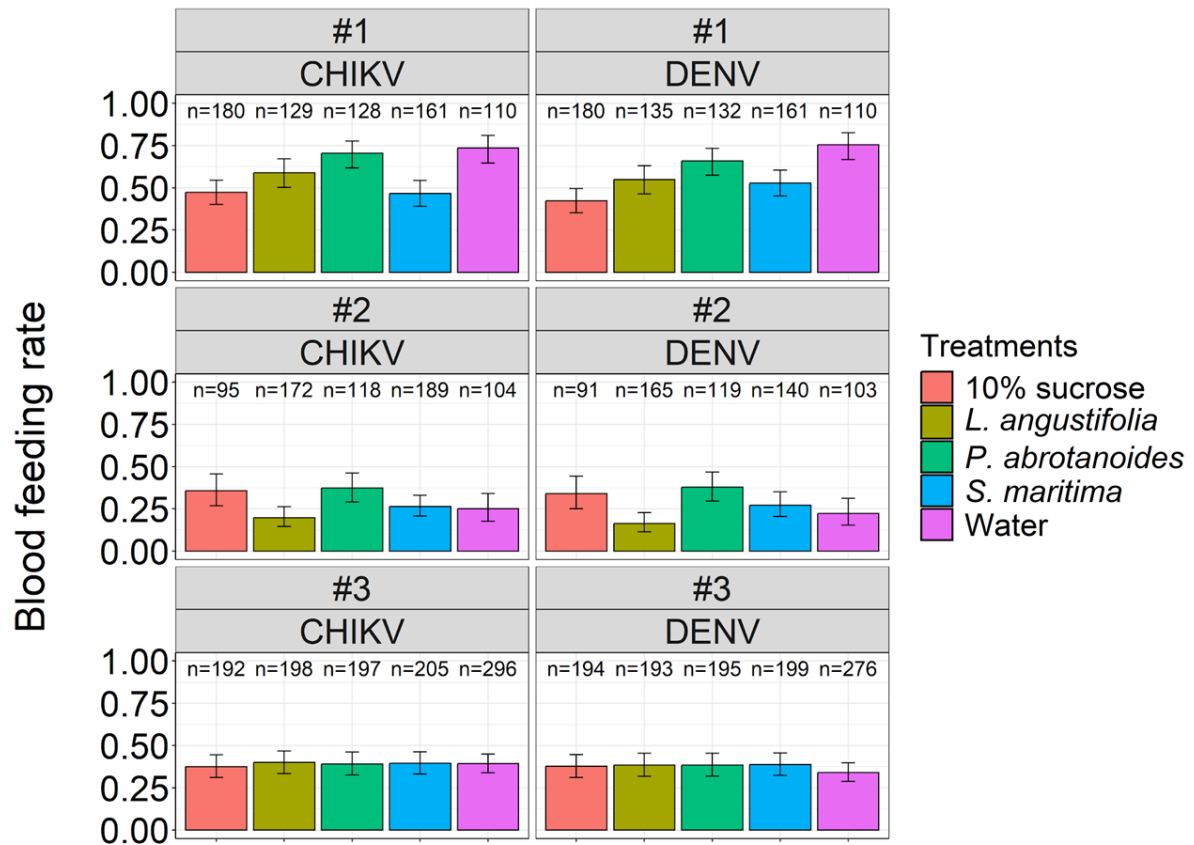


Figure S4: Effect of 3 plant species, water and a 10% sucrose control solution on the blood-feeding rate of mosquitoes exposed to either DENV or CHIKV infectious blood, for each replicate. Each bar represents the blood-feeding rate, expressed as the number of blood-fed females out of the total number of mosquitoes exposed to the blood for each treatment and each virus. The 'n=' represent the sample size for each treatment and virus. The error bars represent the 95% confidence interval.

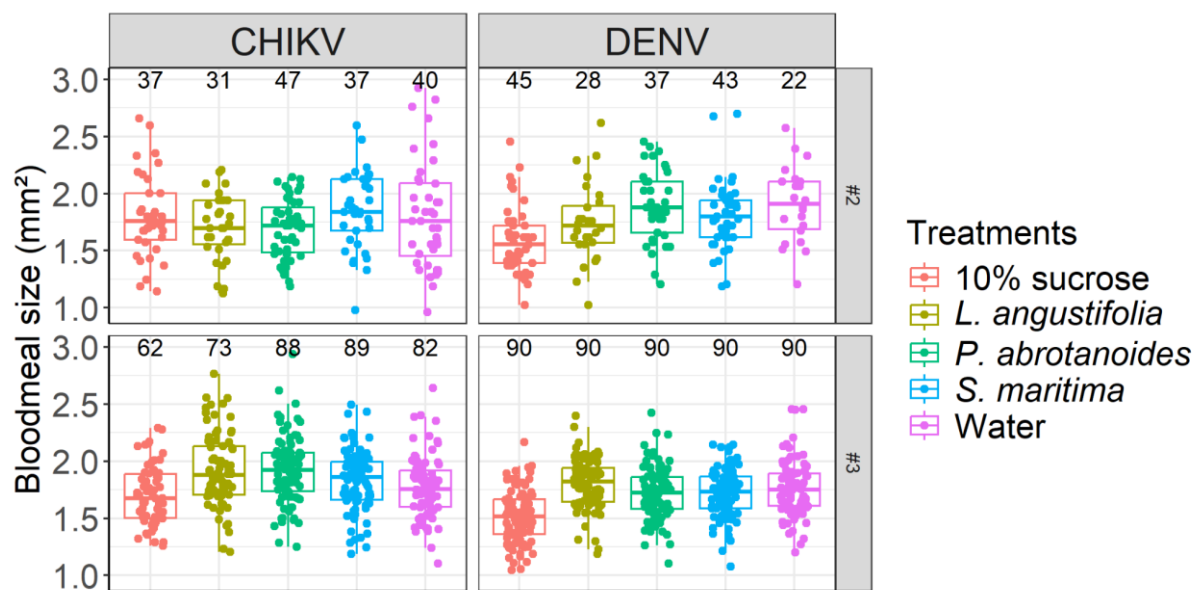


Figure S5 : Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on the blood meal size of *Aedes albopictus* mosquitoes exposed to either DENV or CHIKV infectious blood over replicates 2 and 3. Numbers displayed above the boxes are the total number of measured individuals.

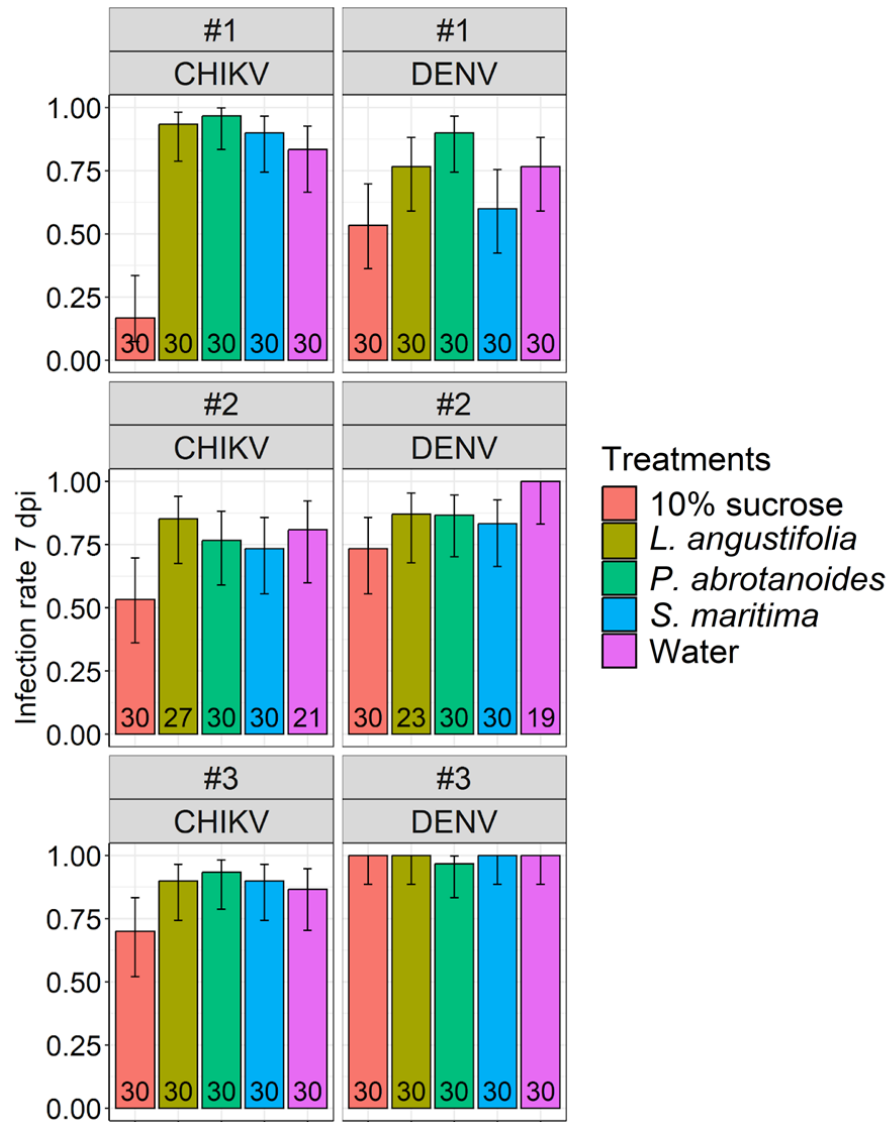


Figure S6. Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV infection rates ($\pm$ 95% CI) at 7 dpi in *Aedes albopictus* females, for each replicate (#1 to 3). Infection rates are the proportions of mosquitoes testing positive by qPCR in their bodies at 7 days post-infectious blood meal (dpi). A) CHIKV and DENV IRs for the first replicate. B) CHIKV and DENV IRs for the second replicate. C) CHIKV and DENV IRs for the third replicate. Numbers displayed inside the bars are the total number of qPCR-tested bodies. The absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment.

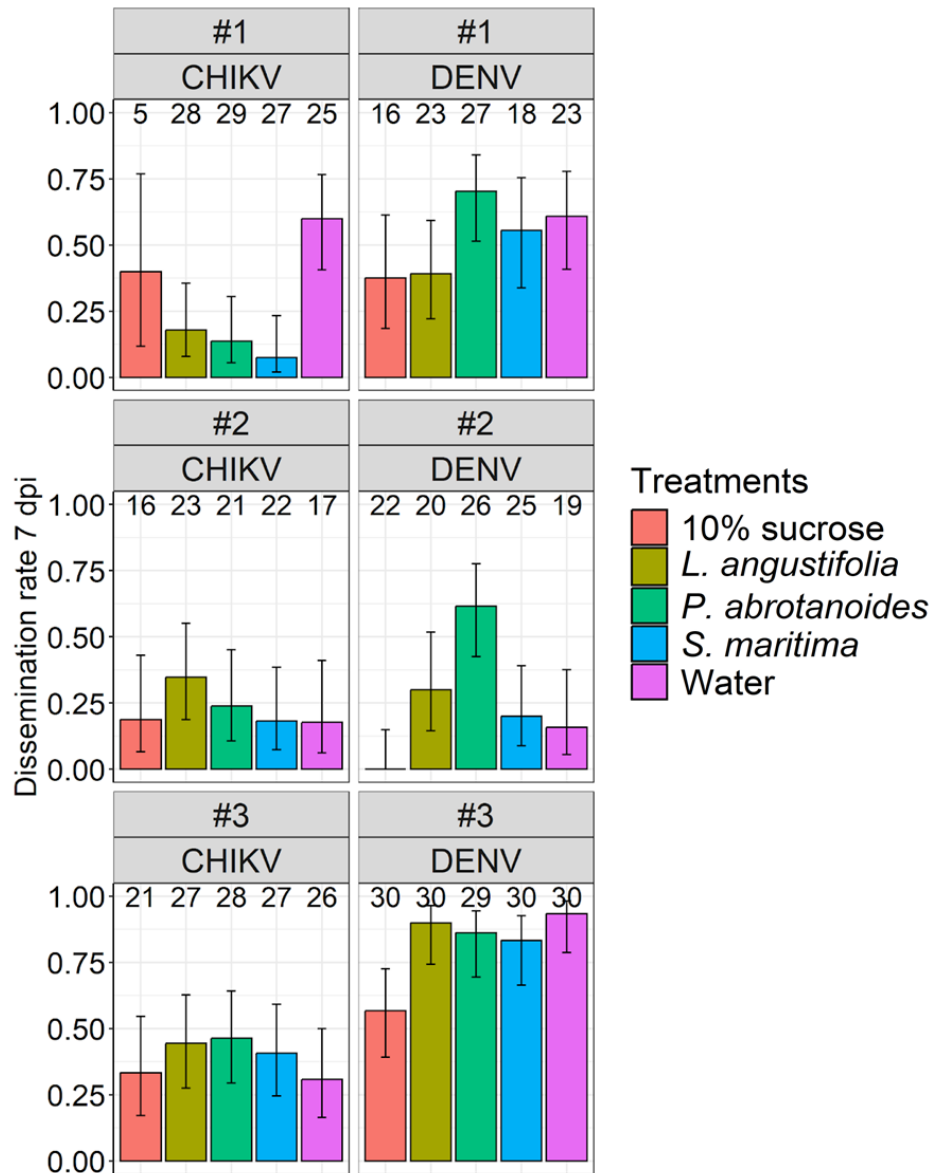


Figure S7: Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV dissemination rates ($\pm$ 95% CI) at 7 dpi in *Aedes albopictus* females, for each replicate (#1 to 3). Dissemination rates are the proportions of mosquitoes testing positive through qPCR in their heads among the mosquitoes displaying qPCR positive bodies. A) CHIKV and DENV DRs for the first replicate. B) CHIKV and DENV DRs for the second replicate. C) CHIKV and DENV DRs for the third replicate. Numbers displayed inside the bars are the total number of qPCR-tested bodies. The absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment.

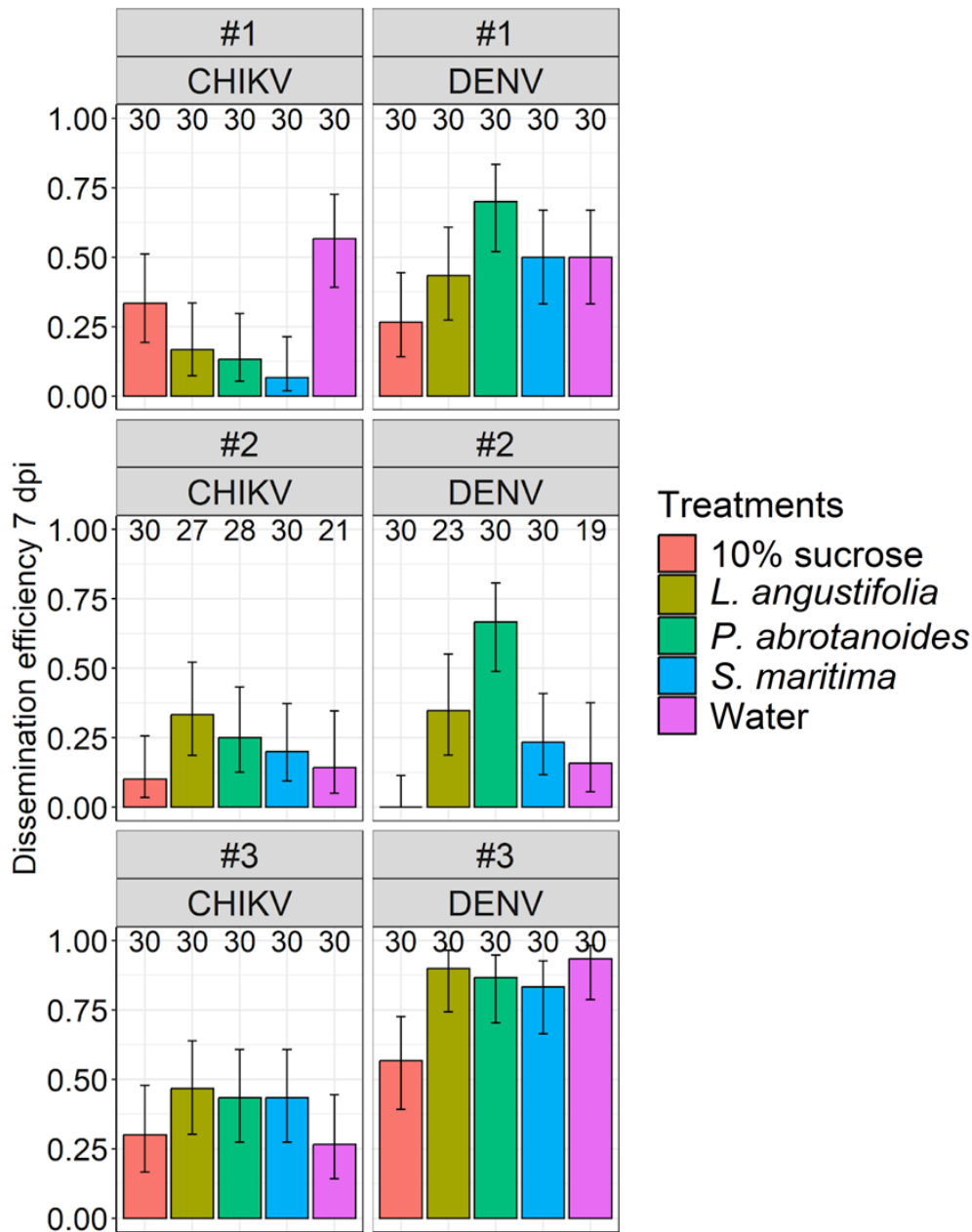


Figure S8: Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV dissemination efficiencies ($\pm$ 95% CI) at 7 dpi in *Aedes albopictus* females, for each replicate (#1 to 3). Dissemination efficiency is the proportion of mosquitoes displaying a qPCR positive head among the tested. A) CHIKV and DENV DEs for the first replicate. B) CHIKV and DENV DEs for the second replicate. C) CHIKV and DENV DEs for the third replicate. Numbers displayed inside the bars are the total number of qPCR-tested bodies. The absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment.

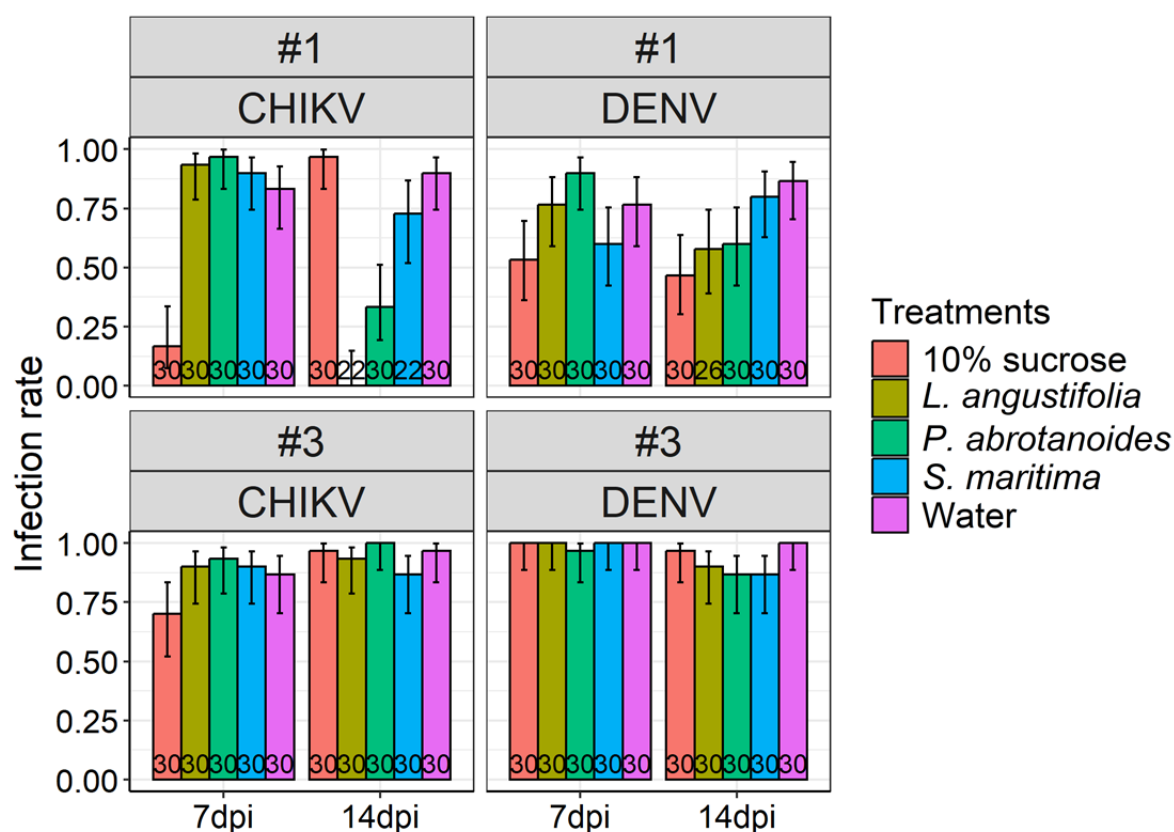


Figure S9: Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV infection rates ($\pm$ 95% CI) at 7 and 14 dpi in *Aedes albopictus* females, among the first and the third replicate (#1 and 3). Infection rates are the proportions of mosquitoes testing positive by qPCR in their bodies at 7 and 14 days post-infectious blood meal (dpi). The upper panel shows CHIKV and DENV IRs for the first replicate, while the lower panel shows CHIKV and DENV IRs for the third replicate. The numbers displayed inside the bars represent the total number of qPCR-tested bodies. The absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment.

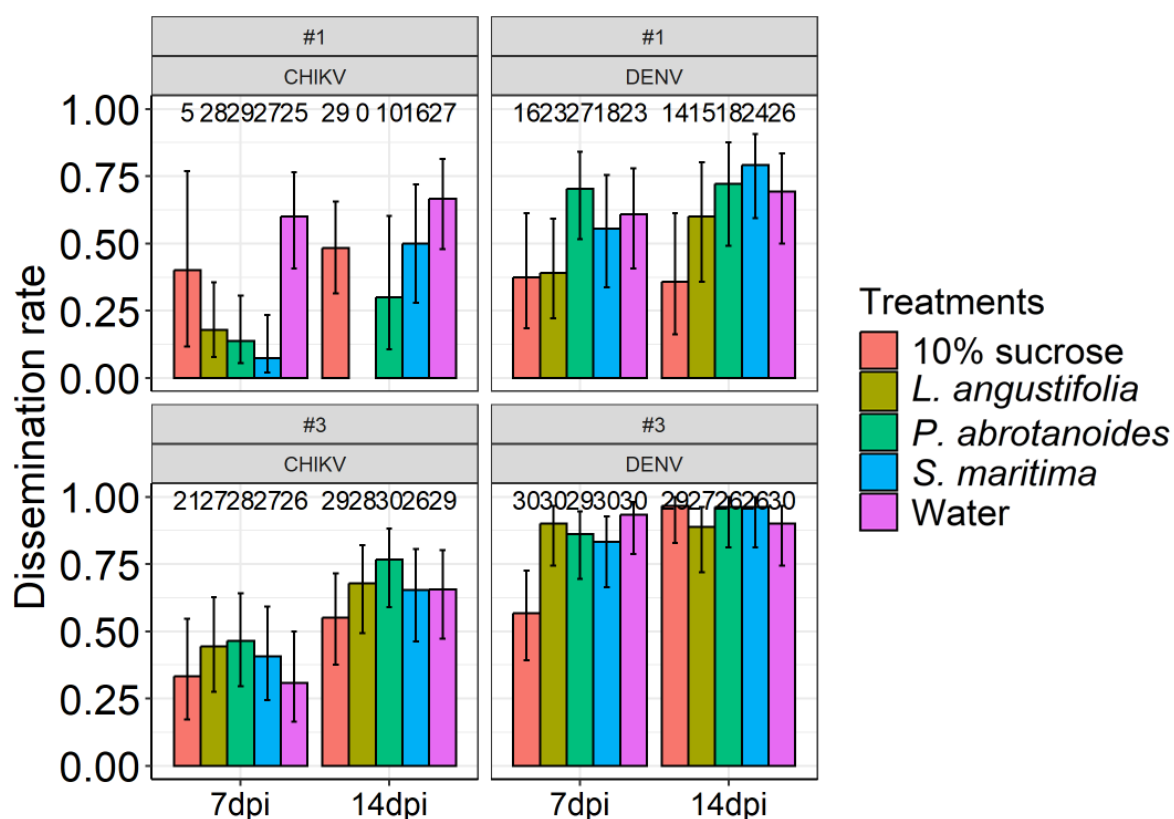


Figure S10: Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV dissemination rates ($\pm$ 95% CI) at 7 and 14 dpi in *Aedes albopictus* females, among the first and the third replicate (#1 and 3). Dissemination rates are the proportions of mosquitoes testing positive through qPCR in their heads among the mosquitoes displaying qPCR positive bodies. The upper panel shows CHIKV and DENV IRs for the first replicate, while the lower panel shows CHIKV and DENV IRs for the third replicate. The numbers displayed inside the bars represent the total number of qPCR-tested bodies. The absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment.

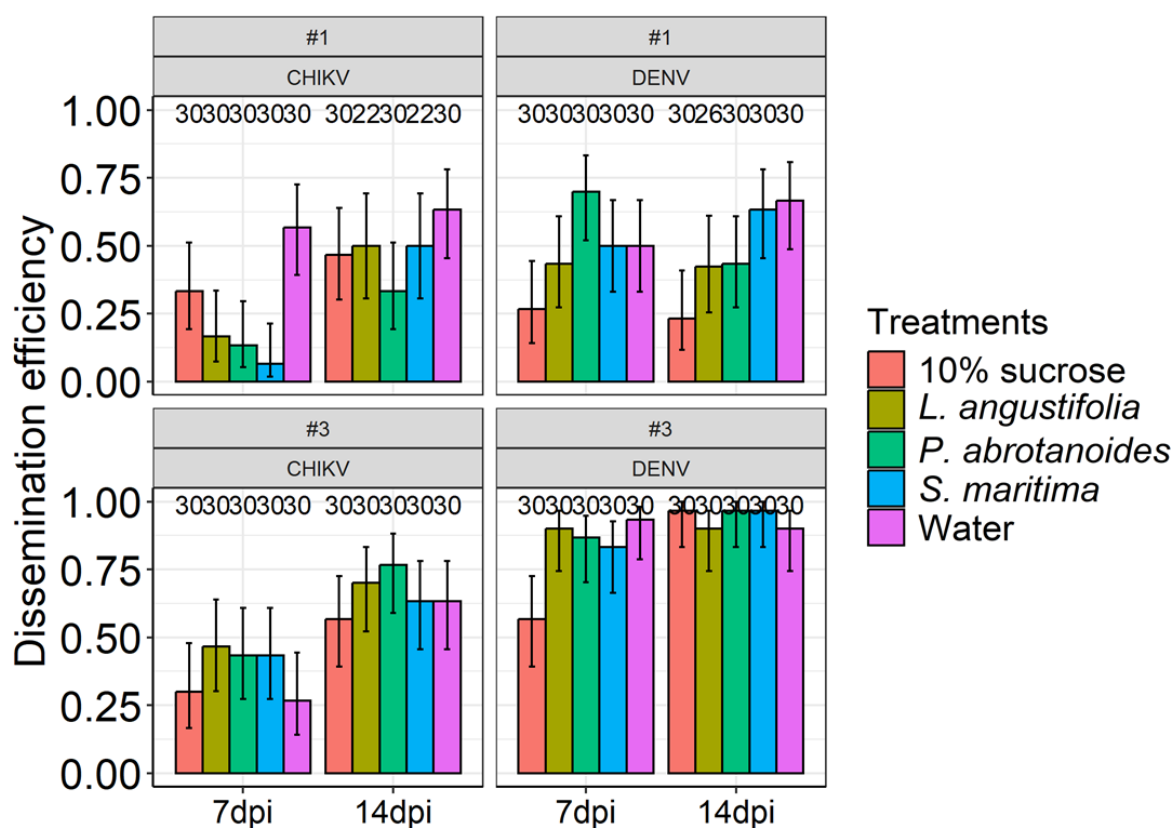


Figure S11: Effect of three plant species, water, and a 10% sucrose control solution on CHIKV and DENV dissemination efficiencies ($\pm$ 95% CI) at 7 and 14 dpi in *Aedes albopictus* females, among the first and the third replicate (#1 and 3). Dissemination efficiency is the proportion of mosquitoes displaying a qPCR positive head among the tested. The upper panel shows CHIKV and DENV IRs for the first replicate, while the lower panel shows CHIKV and DENV IRs for the third replicate. The numbers displayed inside the bars represent the total number of qPCR-tested bodies. The absence of letters in a panel indicates no significant effect of treatment.

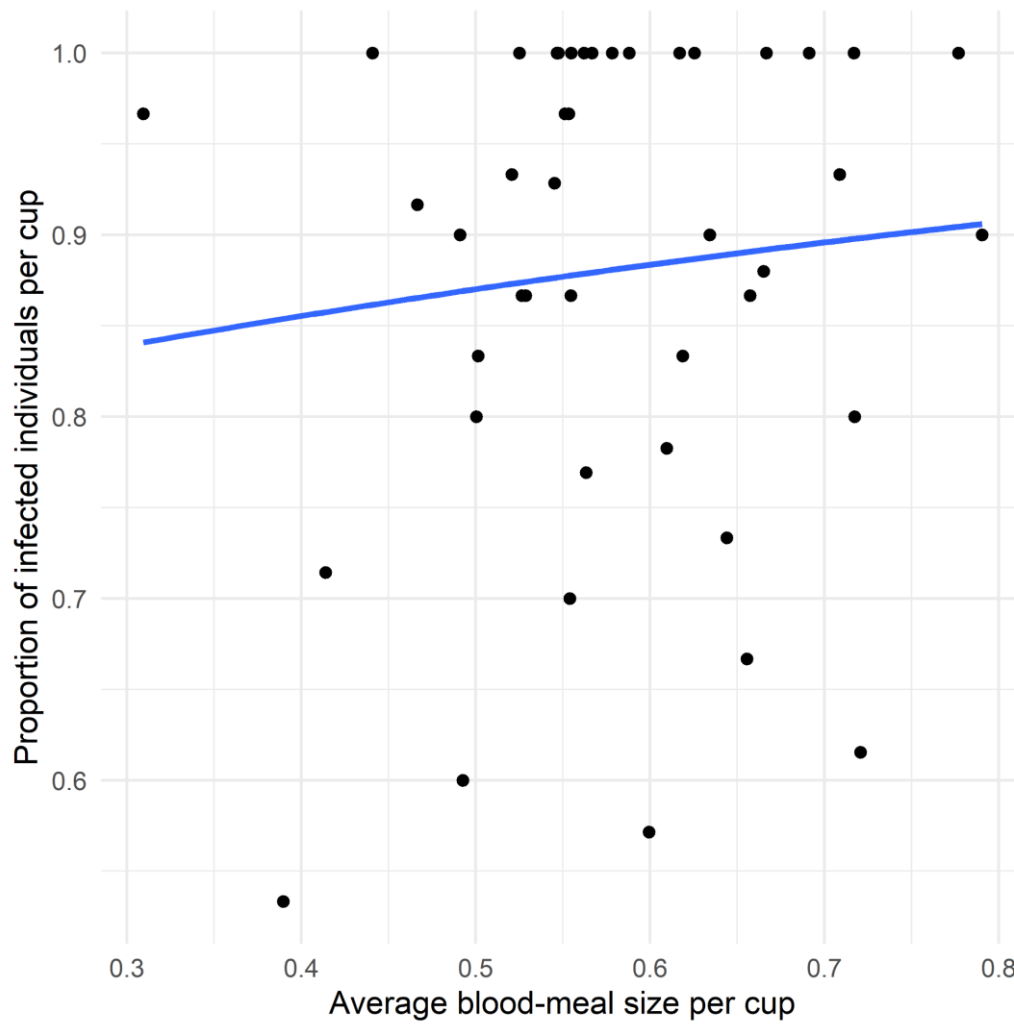


Figure S12: Plot showing the relationship between the average blood meal size and infection levels, at the cup level.

II. Conclusion

Nos travaux offrent un premier aperçu de l'impact de différentes diètes (3 plantes à fleurs, du sucrose 10% et de l'eau) sur la biologie et la compétence vectorielle de colonies de laboratoire d'*Ae. albopictus*. Les divers traitements ont influencé la survie des individus avec le sucrose 10% et *P. abrotanoides* qui ont mené aux meilleurs taux de survie. De plus, nos résultats ont confirmé, une fois de plus, que les femelles survivent plus longtemps que les mâles. Ces observations sont cohérentes avec les résultats du test d'anthrone, où les meilleurs résultats ont été obtenus avec le sucrose à 10 % et *P. abrotanoides*. Toutefois, cette première expérience présente certaines limites et devra être répétée. Concernant la taille du repas de sang, il semble qu'elle n'ait été influencée que par le sucrose à 10 %, ce qui était attendu, car le sucre est connu pour inhiber le repas sanguin par deux mécanismes : en provoquant une sensation de satiété et en réduisant l'espace abdominal disponible pour le repas de sang. Après le repas de sang, une fois que le virus se réplique dans l'intestin du moustique, on peut caractériser le taux d'infection. Ensuite, le taux et l'efficacité de dissémination évaluent la propagation du virus dans les différents organes. Enfin, une fois que le virus a migré dans les glandes salivaires et s'y réplique, on peut quantifier le taux et l'intensité (soit le nombre de particules virales produites dans la salive) de transmission. Nos résultats ont montré que tous les traits de la compétence vectorielle des moustiques étudiés étaient modifiés en fonction du virus et du traitement.

Pour le virus CHIK, les taux d'infection varient selon les traitements. Cependant, les taux de dissémination ne sont pas influencés par les traitements. En ce qui concerne les taux de transmission, ils sont différents à 7 jours post-infection mais pas à 14 jours. Ces pas de temps sont néanmoins tardifs par rapport à la biologie du virus, qui migre dans les glandes salivaires dès le deuxième jour post-infection. Il serait donc judicieux de répéter l'expérience en ajoutant des pas de temps plus précoces tels que 2, 4 ou 6 jours post-infection.

Pour le virus DENV, les taux d'infection diffèrent également entre les traitements, et des différences en termes de dissémination sont aussi observées. Concernant les taux de transmission, il y a peu de différences à 7 jours post-infection, ce qui correspond à la dynamique de répllication du virus, plus tardive par rapport à celle du CHIKV. Toutefois, le traitement *P. abrotanoides* réduit le nombre de particules virales dans la salive.

Par conséquent, nos résultats suggèrent que les différents traitements peuvent influencer la dynamique virale et la période d'incubation extrinsèque des virus. Cet effet des traitements peut être expliqué par plusieurs mécanismes. Premièrement, les plantes peuvent produire des métabolites secondaires tels que les monoterpènes, les composés phénoliques ou les flavonoïdes qui pourraient avoir une activité antivirale. Deuxièmement, les traitements peuvent varier en richesse nutritionnelle, fournissant plus ou moins de ressources énergétiques au virus, ce qui pourrait limiter sa capacité de répllication. Un autre mécanisme possible est l'influence des

traitements sur l'immunité ou le microbiote de l'hôte. Enfin, l'effet des traitements sur la compétence vectorielle pourrait être lié à la taille du repas de sang des moustiques. En effet, une taille de repas de sang plus faible entraîne une dose virale plus petite, réduisant ainsi le taux d'infection. Cependant, notre design expérimental ne permet pas de relier directement la taille du repas de sang au taux d'infection au niveau individuel.

L'effet des traitements dans cette étude est principalement prophylactique, car les moustiques n'ont pas été remis sur leur traitement initial après infection, mais maintenus sur du sucrose à 10%. Il est donc nécessaire d'étudier également l'effet curatif des traitements, ainsi que la combinaison des effets préventif et curatif.

Pour approfondir ces recherches, il serait intéressant de répéter l'expérience avec des populations de moustiques provenant du terrain plutôt que d'élevages. De plus, utiliser des plantes cultivées en serre ou protéger les plantes d'extérieur des pollinisateurs et autres insectes pourrait garantir une quantité suffisante de nectar pour la survie des moustiques. Enfin, les moustiques dans cette expérience étaient assignés à un seul traitement, ce qui ne reflète pas les conditions naturelles. Il serait donc pertinent de mettre en place une expérience permettant aux moustiques de choisir entre différents traitements. Pour étudier les relations entre les moustiques et les plantes qu'ils consomment dans la nature, une technique moléculaire capable d'identifier les espèces végétales consommées serait nécessaire. Ces travaux ont constitué une partie de ma thèse. Le barcode à ADN s'est imposé comme une méthode robuste pour l'identification des espèces végétales en interaction avec les insectes, que le matériel végétal soit ingéré ou présent à la surface de leur corps (Jurado-Rivera *et al.* 2008; Lowe *et al.* 2022). Toutefois, son application présente des limites pour les insectes se nourrissant principalement de petites quantités de nectar, où l'ADN est moins abondant. Malgré ces contraintes, des travaux récents ont démontré la faisabilité d'utiliser le DNA barcoding pour identifier les familles ou espèces végétales consommées par les moustiques, incluant les genres *Aedes* et *Anopheles*, dans leurs habitats naturels (Nyasembe *et al.* 2018).

Dans ce contexte, j'ai contribué au développement d'un outil métabarcoding sans *a priori*, permettant de caractériser simultanément l'éventail des plantes hôtes consommées par les moustiques sur le terrain, ainsi que de déterminer leurs repas sanguins et d'identifier les espèces de moustiques présentes. Cette approche repose sur l'amplification et le séquençage de marqueurs génétiques spécifiques des résidus d'ADN végétal (loci ITS et RbcL) et sanguin (loci 12S et 16S des vertébrés) retrouvés dans les moustiques collectés. Ce travail, toujours en cours, n'est pas inclus dans le présent manuscrit de thèse.

Discussion générale & perspectives

Face à l'accentuation des changements globaux, les maladies infectieuses continuent de s'étendre depuis les zones tropicales vers des zones plus nordiques notamment du fait de l'expansion des vecteurs. À cela s'ajoutent des températures extrêmes rendant de nombreuses régions invivables, ce qui augmente la densité de population humaine dans les zones restantes et donc, les risques de transmission interindividuelle (McMichael 2015; Duval 2020; Tsui *et al.* 2024). L'urbanisation réduit d'une part la surface des espaces naturels non anthropisés mais augmente également les transferts de vecteurs entre la faune sauvage, la faune domestique et/ou les populations humaines, pouvant conduire à des sauts d'espèces par les pathogènes plus facilement.

Les insectes vecteurs de pathogènes jouent des rôles écologiques importants, et leur suppression pourrait entraîner des répercussions. Par exemple, les moustiques, bien qu'étant des vecteurs de nombreux pathogènes, sont également les proies de nombreux prédateurs (Quiroz-Martinez and Rodriguez Castro 2007; Louca *et al.* 2009). De plus en plus d'études soulignent également leur rôle de pollinisateurs (Peach and Gries 2016; Lahondère *et al.* 2020; Foster 2024; Shannon *et al.* 2024). Les gastéropodes d'eau douce, quant à eux, sont pour la plupart détritivores et participent ainsi à la dégradation des matières organiques présentes dans les cours d'eau, et au recyclage des nutriments (Hunter 1980; Pinowska 2002; Schaller 2013). Ces organismes sont également des proies pour certains prédateurs tels que les oiseaux, les poissons et les insectes (Demian and Lutfy 1966; Alexander and Covich 1991; Chimbari and Madsen 2003; Turner 2008). Ce qui m'amène à penser que la lutte antivectorielle dont l'objectif est simplement de réduire ou d'anéantir les populations de vecteurs n'est pas forcément la bonne solution.

Par conséquent, il devient impératif de trouver des moyens de cohabiter avec ces vecteurs tout en limitant la transmission des pathogènes. Il est donc urgent d'identifier les facteurs environnementaux qui influencent la transmission des maladies liées à ces vecteurs, afin de développer des stratégies efficaces de contrôle. Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes concentrés sur la diète et sur le microbiote en tant que facteurs capables de moduler la compétence vectorielle.

Les modèles de cette thèse étaient extrêmement variés, tout comme l'état de connaissances liées à leur biologie, ce qui a conduit à des avancées également diversifiées. Pour le modèle de mollusque *B. truncatus*, j'ai étudié des populations naturelles au Sénégal afin de (i) caractériser leur microbiote et évaluer sa dynamique spatiale dans des sites contrastés, et (ii) déterminer l'origine, génétique ou environnementale, des communautés bactériennes associées. L'objectif initial était de poursuivre par des expériences en conditions contrôlées, mais cela s'est avéré ambitieux. Ainsi, j'avais prévu de modifier le microbiote et d'observer les effets sur la compétence des mollusques. Ces modifications du microbiote devaient se faire (i) en proposant

des régimes alimentaires différents à des individus issus d'une même souche de laboratoire génétiquement très homogène; (ii) par traitements antibiotiques ; ou (iii) par transfert de microbiote après avoir rendu les individus axéniques par stérilisation des œufs (Schols *et al.* 2023). Le but était également d'étudier l'effet de ces modifications du microbiote sur la compétence vectorielle de ces individus. Enfin, il était prévu, pour le modèle *G. truncatula*, d'effectuer des expériences en mésocosme, en faisant varier la température et d'observer les effets à la fois sur la ressource alimentaire disponible mais également, sur le microbiote et la compétence vectorielle des hôtes. Tout ceci se basait sur le fait que l'on pensait pouvoir identifier des liens entre compétence vectorielle et certains membres du microbiote, grâce aux suivis spatial et temporel de terrain. Cependant, du fait des faibles prévalences d'infection obtenues et de la résilience du microbiote après infection (Portet *et al.* 2021), ça n'a pas été le cas.

En ce qui concerne le modèle moustique, j'ai infecté expérimentalement des souches de laboratoire d'*Ae. albopictus* après les avoir nourries avec différents types de diètes. Cela m'a permis de caractériser pour la première fois les effets de sources naturelles de sucre sur (i) la survie et le microbiote, (ii) la prise de repas de sang subséquent (taille du repas et proportion d'individus gorgés), et (iii) la compétence vectorielle pour les virus DENV et CHIKV. Dans le cadre de cette discussion générale j'ai souhaité traiter des différents modèles (gastéropode, moustique) séparément du fait des différences importantes du niveau de connaissance qui existe pour chacun de ces modèles.

I. Modèle *Bulinus truncatus*

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de combler un manque de données sur le microbiote des populations naturelles de *B. truncatus*, jusqu'ici uniquement étudié dans des lignées de laboratoire (Huot *et al.* 2020). De plus, aucune étude préalable ne s'était penchée sur les facteurs qui influencent les communautés bactériennes associées à cette espèce. Nos résultats montrent que la génétique des hôtes a une influence significative sur la structuration de leur microbiote. Cet aspect sera crucial à considérer dans le futur, notamment en vue de potentielles stratégies d'ingénierie ou de modifications du microbiote pour contrôler *B. truncatus*.

Néanmoins, ces travaux, comme tous les travaux scientifiques, ne sont pas dénués de limites. En effet, du haut de mes trois années d'expérience sur le sujet, il y a de nombreuses choses que je ferais différemment aujourd'hui si elles devaient être répétées.

Le microbiote bactérien seul est-il suffisant pour prédire la compétence vectorielle des mollusques ?

Premièrement, nous nous sommes limités dans cette thèse au compartiment bactérien du microbiote uniquement ce qui n'est finalement peut être suffisant pour appréhender toute la complexité des relations entre les mollusques et les parasites qu'ils hébergent. En effet, cette relation est probablement liée à d'autres compartiments de l'holobionte (virus, parasites, champignons, protozoaires...), qui n'ont pas pu être caractérisés dans le cadre de cette thèse. Par exemple, il a été montré qu'au sein de la station biologique de l'Université du Michigan, certains mollusques étaient naturellement infectés par des microsporidies (champignon parasite intracellulaire obligatoire) appartenant au genre *Nosema* (Cort *et al.* 1960). Les chercheurs ont observé le nombre de parasites par mollusques en fonction de l'infection ou non par une microsporidie. Ils en ont conclu que les mollusques ayant des charges élevées en microsporidies avaient des charges parasitaires réduites. Ceci a conduit une autre équipe à regarder l'interaction entre une microsporidie et des trématodes du genre *Schistosoma*. Des mollusques *Biomphalaria glabrata* ont donc été infectés avec une espèce de microsporidie, *Nosema algerae*, ce qui a conduit à une réduction de l'infektivité de *Schistosoma mansoni* en réduisant le nombre de cercaires produites (Lai and Canning 1979). Ces deux articles nous montrent qu'un autre compartiment de l'holobionte, différent des bactéries, peut avoir un effet sur les interactions hôtes-parasites. En passant par le séquençage bactérien seulement, on peut donc passer à côté d'autres compartiments qui peuvent être majeurs dans la compétence vectorielle de ces organismes. Cependant, selon moi, cette étude souligne un second problème. En effet, dans la seconde étude, il est question de transférer une microsporidie provenant d'un moustique à un gastéropode pour observer les effets du champignon sur la compétence vectorielle. Cette étude se base donc sur trois espèces qui n'ont pas co-évolué et qui ne se sont pas adaptées les unes aux autres et on observe la résultante. Ce type d'étude m'a paru majoritaire dans la littérature que j'ai parcourue. Dans la plupart des études, un effet est observé. Néanmoins, dans les études où on prend des espèces qui ont co-évolué, qui se sont adapté et qui ont des interactions équilibrées, on n'observe pas ou peu d'effet. Cependant, ces deux types d'études ne répondent pas aux mêmes objectifs et ont chacune leur importance mais j'ai pu noter un manque conséquent d'études plus réaliste d'un point de vue écologique prenant en compte des microbes en interactions naturelles avec leurs hôtes.

Malgré tout, cette première étude démontre que les microsporidies peuvent influencer la compétence des mollusques. Dans ce contexte, je mène actuellement une étude sur les microsporidies (et leur dynamique temporelle) présentes naturellement dans les populations de *G. truncatula*. J'ai constaté que les taux d'infection par des microsporidies chez mes *Galba* étaient

relativement élevés (74/174, 42,5%) et, parallèlement, qu'aucune *Galba* n'était infectée par *F. hepatica*, bien que ce parasite ait été détecté dans l'environnement aquatique des *Galba* par ADNe. De nombreux facteurs peuvent évidemment expliquer l'absence de *F. hepatica* dans les mollusques, mais ces premiers résultats renforcent l'idée de mieux comprendre les interactions potentielles entre microsporidies et *F. hepatica* au sein de *G. truncatula*. D'autant que pour l'heure, peu de travaux existent sur le sujet.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le microbiote de l'ensemble des mollusque (Bulins ou *Galba*). De fait, je pouvais m'attendre à avoir également extrait le microbiote du parasite. Théoriquement, cela aurait dû me permettre de distinguer un individu sain d'un individu parasité, voire même d'identifier l'espèce du parasite, simplement en observant les communautés présentes. En effet, une étude récente a montré que des trématodes proches phylogénétiquement infectant une même espèce de mollusque n'avaient pas des microbiotes plus similaires que des individus éloignés, ce qui n'est pas forcément intuitif (Salloum *et al.* 2023). Ils ont également montré qu'en cas de co-infection, le microbiote d'un des trématodes prenait le pas sur l'autre et que des transferts unilatéraux de communautés bactériennes avaient lieu. Nos travaux chez *B. truncatus* n'ont pas permis de mettre en évidence des taxons bactériens liés aux individus parasités. Or, il a été démontré grâce à des sondes fluorescentes dirigées contre les bactéries, que le parasite, à tous ses stades de vie, détenait son propre microbiote (Formenti *et al.* 2023). Ainsi, la prochaine étape serait de caractériser ces communautés par métabarcoding afin de voir si elles sont semblables à celles du bulin. Ce qui pose dans tous les cas question, c'est que même si le microbiote du parasite est proche de celui de l'hôte du fait d'une coévolution, on pourrait s'attendre à ce que l'infection du mollusque conduise à des modifications au niveau immunitaire et donc, à des perturbations dans les communautés associées au mollusque ? Cependant, on pourrait se dire que sur le terrain, ces effets peuvent être compliqués à observer. En effet, on trouve peu de mollusques infectés et il n'y a pour l'heure aucun moyen de connaître depuis quand ils sont infectés. De plus, notre diagnostic moléculaire présente la limite d'identifier de l'ADN parasite, or cet ADN peut provenir de parasites vivants mais également, de parasites morts, tués par le système immunitaire, voire de parasites incompatibles qui ne se sont pas développés au sein du mollusque. Par conséquent, il est compliqué, sur le terrain d'établir des liens entre microbiote et compétence vectorielle.

Néanmoins, en laboratoire, l'approche paraît plus simple à mettre en place, et c'est ce que deux équipes se sont attachées à faire : elles ont étudié la dynamique du microbiote de *Biomphalaria glabrata*, suite à l'infestation parasitaire par *S. mansoni* (Portet *et al.* 2021; Nordmeyer *et al.* 2024). La première montre que, dans le modèle *Biomphalaria glabrata*, l'infection par *S. mansoni* conduit rapidement à une dysbiose. Cependant, cette dernière n'est que

de courte durée et le microbiote, résilient, revient rapidement à son état initial 25 jours après l'infection (Portet *et al.* 2021). De la même manière, toujours chez *Biomphalaria glabrata*, une autre étude s'est focalisée sur le microbiote spécifique des organes qui sont en contact avec le parasite : l'hémolymph et l'hépatopancréas (Nordmeyer *et al.* 2024). Ils ont démontré que le microbiote organe-spécifique était plutôt stable au cours de l'infection. Seul le microbiote de l'hémolymph a été légèrement altéré durant la période pré-patente d'infection mais est rapidement revenu à son état initial. Finalement, ces deux études tendent à montrer que l'effet de l'infection sur le microbiote bactérien seul n'est pas aussi fort que ce que l'on pourrait penser. Cet effet limité de l'infection pourrait être lié à la longue co-évolution existante entre l'hôte et le parasite. Par conséquent, le microbiote bactérien n'est peut-être pas un acteur clé/suffisant pour établir un lien avec la compétence des mollusques.

Limites techniques et perspectives

1) Liées aux études du microbiote

Les communautés identifiées à la fin du processus de séquençage peuvent différer considérablement de celles qui étaient présentes initialement dans l'échantillon (Brooks *et al.* 2015). Chaque étape, de l'extraction du matériel génétique au séquençage, peut introduire des biais. Les protocoles d'extraction (Whitehouse and Hottel 2007; Feinstein *et al.* 2009; Hong *et al.* 2009), le design et le choix des amorces utilisées (Shinoda *et al.* 2009; Bergmann *et al.* 2011; Abellan-Schneyder *et al.* 2021), les biais d'amplification PCR (Kanagawa 2003; Pinto and Raskin 2012), les artéfacts produits lors du séquençage (Schloss *et al.* 2009; Haas *et al.* 2011; Lee *et al.* 2012) et la profondeur de séquençage (Dubourg *et al.* 2013; Paulson *et al.* 2013) sont autant de sources potentielles de biais. Des contrôles permettent de limiter ou tout du moins, de mettre en évidence les biais induits. Par exemple, on peut traiter plusieurs fois un même échantillon en variant les techniques d'extraction, les amorces utilisées, et le nombre de cycles de PCR, ou utiliser des contrôles commerciaux. Ces derniers, appelés 'mock-communities', sont des mélanges d'acides nucléiques créés *in vitro* pour simuler la composition d'échantillons bactériens, avec des quantités connues pour chaque espèce. Après séquençage de ces échantillons, on peut détecter d'éventuels biais d'amplification et de séquençage. Il est même possible d'introduire ces contrôles à différentes étapes du processus : un extrait en même temps que les échantillons (pour évaluer les biais dans l'extraction) et un autre, directement composé d'ADN, amplifié avec les échantillons (pour évaluer les biais d'amplification et de séquençage). Ces contrôles peuvent aider à identifier les biais qui favoriseraient certaines communautés au détriment d'autres. Si des biais sont identifiés, ils peuvent potentiellement être corrigés, par bio-informatique ou simplement pris en

compte dans les résultats. Dans ces travaux de thèse, ce type de contrôle de type mock community aurait pu être utilisé.

En ce qui concerne le choix d'un marqueur pour le métabarcoding bactérien, nous avons opté pour l'ADNr 16S dont le principal atout est la richesse des bases de données associées. Néanmoins, elles sont surtout riches en bactéries liées à l'humain, qu'elles soient d'importance clinique ou qu'elles appartiennent à son microbiote (Yang and Iwasaki 2014; Philip *et al.* 2024). Ainsi, de nombreux taxons environnementaux restent non caractérisés et se retrouvent sans affiliation taxonomique. Parmi les amorces utilisables pour étudier le microbiote bactérien par le biais de l'ADNr 16s, celles utilisées dans ces travaux ont été démontrées comme étant les meilleures pour étudier les communautés présentes dans le sol (Thijs *et al.* 2017; Rausch *et al.* 2019). Peut-être que pour mieux appréhender les relations hôtes-parasites dans toute leur complexité, d'autres technologies que le séquençage Illumina telles que le whole-genome, le transcriptome, le métabolome, le métagénome, le séquençage microbien unicellulaire et l'analyse intégrative multi-omique seraient plus appropriées (Sun *et al.* 2024).

Il a été démontré à de nombreuses reprises que les analyses bio-informatiques pouvaient produire des résultats très différents, selon les filtres appliqués (Plummer *et al.* 2015; Almeida *et al.* 2018; Ducarmon *et al.* 2020; Sierra *et al.* 2020; Abellan-Schneyder *et al.* 2021; Chiarello *et al.* 2022). Actuellement, il existe encore peu de protocoles harmonisés au sein de la communauté pour garantir une cohérence dans les analyses, même si certaines initiatives tentent de remédier à cela.

Pour les analyses de communautés bactériennes, deux approches existent : celle des OTU (Operational Taxonomic Units) et celle des ASV (Amplicon Sequence Variants). Les OTU sont créés en regroupant des séquences similaires en clusters, selon un seuil de similarité. Chaque cluster est considéré comme une unité taxonomique opérationnelle, représentant une espèce ou un groupe d'espèces proches. Les ASV sont des séquences individuelles obtenues après avoir éliminé les erreurs de séquençage et les séquences issues d'organismes non bactériens. Chaque séquence est traitée comme une entité distincte, même si elle diffère d'une seule paire de bases (Callahan *et al.* 2017). L'avantage principal des OTUs réside dans leur simplicité d'utilisation. Néanmoins, elles peuvent manquer de résolution pour identifier des différences fines et peuvent introduire des biais en fonction du seuil choisi. De plus, dans la mesure où la composition des OTUs dépend des analyses réalisées et du seuil de similarité choisi, elles sont à priori différentes d'une étude à l'autre, les rendant non comparables. Les ASV à l'inverse offrent une résolution plus fine et une meilleure reproductibilité, facilitant la comparaison entre différentes études (Fasolo *et al.* 2024). Néanmoins, cette approche peut conduire à une surestimation biaisée de la diversité. Finalement, le choix ASV vs OTU dépend de ce que l'on étudie. Dans le cas de microbiote bactérien, l'approche

ASV me paraît plus appropriée. En revanche, dans la caractérisation des espèces de trématodes présentes dans un échantillon, l'approche des OTU me paraît mieux.

En outre, l'identification de la présence de la bactérie après analyse ne signifie pas forcément que cette dernière est active ou vivante. En effet, le séquençage de l'ADNr 16s permet d'obtenir un aperçu complet des communautés microbiennes, incluant à la fois les organismes vivants et les morts. Ceci permet d'appréhender la composition et la diversité globale du microbiote. Passer par des techniques de séquençage de l'ARN pourrait permettre de n'étudier que les bactéries vivantes (Li *et al.* 2017) mais également d'étudier les fonctions biologiques associées par RNA-seq (Croucher and Thomson 2010). Néanmoins, l'ARN étant plus instable que l'ADN, il demande plus de précautions (Gorokhova 2005).

Enfin, dernier point qui concerne les analyses de microbiote, celui du choix des indices de bêta-diversité. Il en existe deux principaux : l'indice de Jaccard et celui de Bray-Curtis. L'indice de Jaccard mesure la similarité entre deux échantillons en fonction des espèces présentes/absentes. Il compare le nombre d'espèces communes aux deux échantillons par rapport au nombre total d'espèces et varie de 0 (aucune espèce commune) à 1 (toutes les espèces en commun) (Jaccard 1901). L'indice de Bray-Curtis mesure la dissimilarité entre deux échantillons, en tenant compte de l'abondance des espèces. Il compare donc non seulement les espèces mais également leur abondance au sein des échantillons et varie de 0 (identiques en termes d'espèces et d'abondance) à 1 (aucune espèce en commun) (Bray and Curtis 1957). L'indice de Bray-Curtis est plus résolutif car il prend en compte l'abondance des communautés, contrairement à l'indice de Jaccard, qui ne considère que la présence/absence. Cependant, étant donné que le séquençage MiSeq produit des données qualitatives plutôt que quantitatives, l'utilisation d'un indice basé sur l'abondance peut introduire des biais (Gloor *et al.* 2017). Dans un contexte de conservation, nous avons donc opté pour l'indice de Jaccard qui, bien que moins résolutif, est plus robuste pour les jeux de données qualitatives tels que ceux obtenus par séquençage de l'ADNr 16S (Bakker 2024).

2) Liées à la caractérisation des trématodes infectant les mollusques

Pour l'identification des individus parasités, nous avons allié les techniques d'émission cercarienne et de diagnostic moléculaire. La première comporte la limite principale qu'il n'existe pas de protocole harmonisé concernant la durée pendant laquelle les mollusques sont mis à émettre. La seconde comporte un autre type de limite : le fait qu'une trop grande quantité d'ADN conduit à une inhibition de la PCR et donc à de faux négatifs. Dans ce contexte, j'ai développé une méthode permettant de limiter cette contrainte en utilisant un contrôle interne de PCR (plasmide). Cette méthode a permis de définir qu'une dilution systématique au 100ème des ADNs

de mollusques permet de limiter les inhibitions au cours des PCRs et d'optimiser la détection des parasites en développement dans les mollusques. Enfin, les bases de données publiques sont peu fournies et ne permettent pas toujours d'identifier l'espèce et les données qu'elles contiennent ne sont pas toujours très fiables. Enfin, les corrections qui pourraient être apportées ne sont pas mises directement dans la base de données, mais seulement dans les publications scientifiques qui les corrigent, ce qui peut conduire à de mauvaises assignations taxonomiques.

3) Perspectives

L'étude de la variation du microbiote des populations de bulins du Nord du Sénégal établies dans divers sites écologiquement contrastés permet de voir que ce dernier est structuré spatialement. Néanmoins, pour compléter ces résultats, une étude temporelle du microbiote de populations naturelles d'escargots d'eau douce au cours des saisons, permettrait d'identifier des facteurs environnementaux qui pourraient moduler le microbiote de ces organismes. C'est ce que j'ai fait au cours de mes travaux de thèse mais sur un modèle différent. Afin de faciliter le suivi, je l'ai réalisé en Camargue, sur le domaine de la Tour du Valat, sur le modèle *G. truncatula*. Ce suivi a duré 14 mois entre mars 2022 et juin 2023. Lors des suivis mensuels, j'ai prospecté trois sites sur lesquels j'ai relevé (i) les paramètres environnementaux abiotiques et biotiques, (ii) l'ADN environnemental lié à l'eau et aux sédiments, (iii) les mollusques, (iv) la fréquentation par la faune sauvage. L'ensemble du matériel et méthodes et des résultats préliminaires liés à ces travaux actuellement en cours de valorisation sous forme d'article scientifique, est présenté en annexe n°1. Les résultats principaux de cette étude montrent une fois encore, que le microbiote des mollusques est distinct du microbiote environnemental dans lequel ils vivent. Ces résultats étaient attendus à la vue des résultats obtenus dans le premier chapitre et des résultats issus de la littérature (Huot *et al.* 2020; McCann *et al.* 2024). Cependant, le résultat le plus intéressant réside dans la variation du microbiote au fil des mois et plus particulièrement au fil des saisons. Une étude génétique sur la base de microsatellite démontre par ailleurs que toutes les *G. truncatula* pour lesquelles le microbiote a été caractérisé sont toutes issues d'une même entité génétique faiblement diversifiée. Cela suggère que certains facteurs environnementaux modulent les communautés bactériennes associées à *G. truncatula* au cours du temps. L'identification de ces facteurs est en cours.

Enfin, il est possible que l'échelle de nos études ne soit pas la plus appropriée. En effet, l'hôte dépasse son microbiote bactérien et est désormais considéré comme un véritable holobionte. Au-delà de cette entité, et compte tenu des effets que les facteurs environnementaux peuvent avoir sur la compétence des hôtes dans divers modèles, il pourrait être pertinent de

passer d'une approche centrée sur la compétence des hôtes à une perspective plus large, en étudiant la compétence des holobiontes voire même la compétence des écosystèmes (Douchet *et al.* 2023). Un hôte peut être compétent pour un pathogène, mais les organismes avec lesquels il est en interaction ou l'écosystème dans lequel il vit peut aussi jouer un rôle en amplifiant ou en atténuant la circulation du pathogène.

II. Modèle *Aedes albopictus*

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de combler un manque de données sur les relations entre *Ae. albopictus* et les repas d'origine végétale. En effet, quelques travaux se sont intéressés à ces liens mais dans le modèle *Anopheles/Plasmodium* (Hien *et al.* 2016; Mizushima *et al.* 2023). Nos résultats montrent que les repas végétaux ont un effet sur la survie et sur la prise du repas de sang mais également sur la compétence vectorielle. Néanmoins, à nouveau, ces travaux ne sont pas dénués de limites.

Les études de compétence vectorielle en laboratoire sont-elles directement transposables à ce qu'il se passerait *in natura* ?

Nos résultats montrent donc que la ressource alimentaire à disposition peut modifier la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus*. Néanmoins, cette étude s'est déroulée en laboratoire et ces résultats ne sont probablement pas directement transposables *in natura*. Premièrement, le comportement et les traits d'histoire de vie des souches de laboratoire ne correspondent plus tout à fait à ceux des populations naturelles. En effet, en conditions de laboratoire, pratiquement tous les paramètres environnementaux (température, lumière, humidité, cycles circadiens) sont contrôlés et constants. Ainsi, les individus n'ont pas à s'adapter constamment à de nouvelles conditions et commencent rapidement à être 'domestiqués' (Rose *et al.* 2024).

Ensuite, les individus d'une même souche de laboratoire vont présenter un fond génétique similaire. Or, la compétence des moustiques étant dépendante de leur fond génétique, l'utilisation de populations provenant de diverses localisations aurait probablement pu conduire à des résultats différents en fonction de l'origine et donc de la génétique des individus (Viglietta *et al.* 2021).

Enfin, la survie des individus diffère grandement entre les souches de laboratoire et de terrain (Brady *et al.* 2013). En effet, *in natura*, les individus sont confrontés à des conditions environnementales qui peuvent ne pas être favorables mais également à tout un tas de prédateurs.

Or, un moustique infecté par un virus doit pouvoir vivre suffisamment pour que ce dernier puisse avoir le temps de se répliquer et de migrer dans les glandes salivaires, sans quoi, la transmission est impossible. En conditions idéales contrôlées de laboratoire, la majorité des individus atteignent un tel stade. Néanmoins, ça n'est pas forcément le cas *in natura*. En outre, l'âge du moustique est également important à prendre en compte. En effet, un individu plus âgé aura donné le temps nécessaire au virus de se répliquer, néanmoins, il aura aussi eu le temps de développer une réponse immunitaire plus efficace contre le parasite. Par exemple, dans le cas de *P. falciparum*, les individus *Anophèles* les plus âgés sont moins compétents pour le pathogène (Somé *et al.* 2024).

Néanmoins, ce passage par une souche d'élevage est primordial car cela facilite grandement la mise en place des expériences. Par exemple, obtenir les mêmes effectifs (soit 12 000 larves uniquement pour le troisième réplica) ou le même taux de gorgement sur repas de sang artificiel aurait été beaucoup plus compliqué avec des souches de terrain. De plus, cela permet de normaliser tous les autres traits qui pourraient jouer sur la compétence et de n'observer que les effets de la diète. Une manière d'améliorer les choses serait de publier extensivement et en détail les protocoles utilisés pour, *in fine*, harmoniser au maximum les études de compétence vectorielle réalisées par différents laboratoires (Azar and Weaver 2019). Bien qu'une standardisation parfaite des protocoles soit compliquée à mettre en place au vu des différences de moyens entre laboratoire, standardiser les traits de la compétence étudiés constituerait un premier pas (Wu *et al.* 2022).

Enfin, *in natura*, les moustiques ont accès à une grande variété de fleurs. Dans notre design expérimental, ils ne sont exposés qu'à une seule espèce, sans choix possible. Or, peut être que le fait de se nourrir de jus sucré issu de différentes plantes peut avoir un effet sur la compétence finale observée (Paré *et al.* 2024).

Limites techniques des travaux et perspectives

Premièrement, les expériences de survie présentent des défis logistiques importants. La taille réduite des cages complique le changement quotidien des bouquets puisqu'il faut retirer l'ancien et insérer le nouveau tout en évitant les échappées de moustiques. Or, dans mes conditions de travail, utiliser des cages plus grandes n'est pas envisageable en raison du manque d'espace dans les enceintes climatiques. De plus, les bouquets provenant de l'extérieur peuvent introduire des insectes prédateurs potentiels, comme des araignées ou des fourmis, qui pourraient se nourrir des moustiques morts ou vivants (Paré *et al.* 2024). Cela peut entraîner une diminution du nombre total de moustiques par rapport au nombre initialement introduit. Enfin,

le fait de cueillir les bouquets limite la quantité de nectar disponible. Pour répondre à tous ces problèmes, il faudrait faire pousser les plantes en conditions contrôlées, sous serre.

Ensuite, concernant l'étape d'infection expérimentale, on dispose de deux cages par traitement, qui contiennent à la fois des mâles et des femelles moustiques. Pour l'infection expérimentale, seules les femelles sont nécessaires. Il faut donc sélectionner ces dernières et les répartir dans plusieurs boîtes où le repas de sang sera pris. Pour le premier et le second réplica, nous avons choisi d'endormir les moustiques sur glace. Pour cela, nous avons utilisé un petit aspirateur de table à débit réduit pour aspirer un maximum d'individus, puis nous avons fermé le tube et l'avons placé sur glace. Après quelques minutes, les moustiques sont endormis et nous les vidons dans une boîte de Pétri pour trier les mâles et les femelles, puis répartir ces dernières dans les boîtes d'infection. Cette technique est précise car, dans la mesure où les individus sont endormis, ils sont faciles à trier et compter. Néanmoins, elle fragilise les individus en raison du passage sur glace, aggravant leur état déjà affaibli par le manque de ressources alimentaires, notamment pour ceux maintenus sur eau, ce qui peut entraîner un fort taux de mortalité avant infection. C'est d'ailleurs ce qu'il s'est passé pour le second réplica, ce qui a conduit à des effectifs réduits et à une réalisation du timepoint à 7 jours post-infection seulement (du fait d'un nombre d'individus insuffisant pour faire les deux timepoints). Pour le troisième réplica, nous avons aspiré manuellement les moustiques un par un à l'aide d'aspirateurs buccaux, évitant ainsi l'étape d'endormissement. Cette méthode a pour avantage de moins fragiliser les populations mais est cependant moins précise car les moustiques réveillés peuvent potentiellement s'échapper.

On peut également se demander si les photos constituent un bon proxy pour évaluer la taille des repas de sang pris. Un des biais potentiels de ce mode d'évaluation est lié à la diurèse post-repas de sang. En effet, chez *Ae. albopictus*, la prise d'un repas de sang entraîne une excrétion d'une fraction d'eau et des électrolytes ingérés durant le repas (Esquivel *et al.* 2014). Cette excrétion dure jusqu'à deux heures après le repas et entraîne une diminution de la taille de l'abdomen et peut donc potentiellement mener à une sous-estimation de la taille du repas de sang. Elle est liée au fait que l'hémolymph du moustique est beaucoup plus concentrée que le sang ingéré. Ainsi, l'eau contenue dans ce dernier pourrait diluer l'hémolymph (Williams *et al.* 1983). Généralement, l'évaluation de la taille du repas de sang passe par le dosage d'un sous-produit de dégradation de l'hémoglobine, soit dans le moustique que l'on écrase directement dans un réactif, soit dans les excréta (Briegel *et al.* 1979; Houseman and Downe 1986). Dans mes travaux, j'ai privilégié les photos car les techniques de dosage demandent d'individualiser les moustiques qui, dans mes expériences étaient nombreux. De plus, ces techniques demandent de sacrifier les individus, ce qui n'est pas compatible avec mes expériences. Une manière de ne pas sacrifier

d'individus pour doser l'hématine serait d'individualiser les individus et de doser l'hématine dans leurs excréta (Briegel 1980).

Les timepoints de 7 et 14 jours post-infection sont adaptés pour les analyses de compétence vectorielle pour le virus de la dengue, mais ils sont trop tardifs pour évaluer celle pour le chikungunya. Pour y remédier, on aurait pu utiliser des timepoints différents pour chaque virus, en choisissant des timepoints plus précoces pour le chikungunya. Une autre solution, peut-être plus précise, consiste à analyser les cotons de jus sucré sur lesquels les moustiques sont maintenus après l'infection. Il a été démontré qu'il est possible de doser des pathogènes dans ces cotons (Hurk *et al.* 2007; Guissou *et al.* 2021). L'avantage majeur de cette technique est qu'elle n'est pas destructrice et permet de conserver les individus vivants. De plus, le coton de jus sucré peut être analysé quotidiennement après l'infection si nécessaire, offrant un suivi plus précis de la période extrinsèque d'incubation et de la transmission que dans mes travaux. En effet, on pourrait déterminer à partir de quel jour les particules virales sont excrétées dans la salive. Cette technique est utilisable car, comme lors de la prise du repas de sang, les moustiques salivent lors de la prise de repas de sucre. Cette sécrétion de salive leur permet non seulement de faciliter l'ingestion en diluant les nectars concentrés, mais aussi d'initier la digestion du sucre. Une technique similaire pourrait être utilisée avec les excréta (Ferguson and Read 2004), bien que plus compliquée à mettre en œuvre, car les moustiques sont incubés dans des boîtes en carton, constituées d'un cylindre de carton fermé en haut et en bas par une moustiquaire (**Figure 15**). Ainsi, il faudrait disposer ces boîtes en cartons sur des papiers filtres sur lesquels on collecterait les excréta (mais il y aurait forcément de la perte qui pourrait rester sur le voile moustiquaire, à l'intérieur de la boîte).

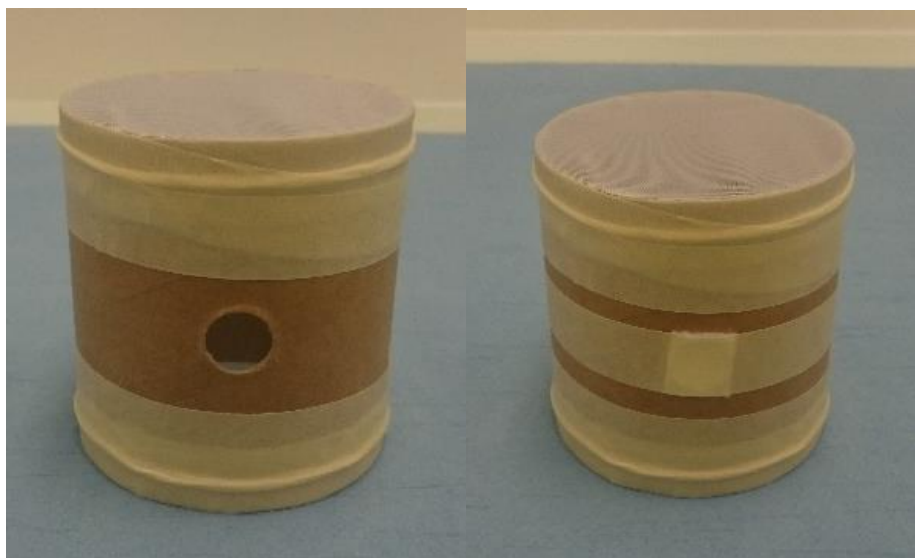


Figure 16 : Photographie d'une boîte en carton, dans laquelle les moustiques infectés sont incubés (crédits : manuel d'infection expérimentale, MIVEGEC, Davy Jiolle)

Enfin, dans notre design expérimental, nous n'avons pas pu ré-assigner les moustiques à leur traitement après infection. Ceci est dû au fait qu'on nourrit nos individus sur des bouquets de fleurs, qui ne rentrent pas dans les boîtes d'incubation. Le changement journalier des bouquets complique d'autant plus les choses. Or, dans la nature, les moustiques alternent repas de sang et repas de jus sucré. Administrer simplement des broyats de plantes ne serait pas pertinent dans la mesure où on ne sait pas sur quoi nos individus se gorgent. Par conséquent, il faudrait trouver une solution pour que les individus soient en contact avec les bouquets, tout en restant séparés de ces derniers afin de pouvoir changer les bouquets sans avoir d'individus qui s'échappent.

III. Considérations communes aux trois modèles étudiés

De manière générale, quelle que soit la technique, quel que soit le modèle, on fait face à un manque de standardisation et chaque laboratoire utilise ses propres technologies. Souvent, ces protocoles sont utilisés depuis de nombreuses années et, bien qu'ils aient des biais, ils conduisent à des résultats plus ou moins satisfaisants. Par conséquent, on ne cherche pas forcément à les améliorer ou les optimiser. Mais on peut tout de même se questionner si les résultats issus de différents laboratoires sont réellement comparables.

Pour correctement étudier la transmission de maladies émergentes dans toute sa complexité, il faudrait désormais amener du laboratoire là où j'ai fait du terrain et du terrain là où j'ai fait du laboratoire ! En effet, le suivi spatial du microbiote des bulins au Sénégal ne m'a pas permis d'établir des liens entre facteurs environnementaux, microbiote et compétence vectorielle du fait principalement d'une faible prévalence d'infection par des trématodes et par manque de relevé des données environnementales écologiques. Ainsi, il faudrait passer en laboratoire afin de (i) tenter de modifier le microbiote des individus en modulant des facteurs tels que le pH, la température ou d'autres facteurs abiotiques (voire en mésocosme), (ii) tenter de modifier le microbiote des hôtes par changement de diète, (iii) tenter de modifier le microbiote des escargots par traitements antibiotiques et/ou transplantation de microbiote. Une fois le microbiote modifié, réaliser des infestations expérimentales et observer les effets sur la prévalence et l'intensité d'infestation des escargots. Ces expériences seraient à réaliser premièrement sur des souches de laboratoires, pour lesquelles les comportements sont connus ; mais également sur des souches de terrains qu'on infesterait expérimentalement.

Il faudrait caractériser la diète des mollusques en conditions naturelles afin de voir si le microbiote est influencé ou non, par cette dernière. L'étude des liens entre diète et compétence d'*Ae. albopictus* méritent d'être explorés sur des populations provenant du terrain, qui ont gardé une biologie et une physiologie plus 'naturelles' que la souche d'élevage utilisée dans le chapitre 2 de ces travaux de thèse.

Restaurer de plus larges espaces comportant de grandes quantités de fleurs locales productrices de nectar (type romarin) serait également une piste puisqu'il a été montré qu'il existait une sorte de 'balance' dans le potentiel de transmission, entre les repas de sang et les repas sucrés (Foster 1995). En effet, cette dernière peut conduire à la satiété et réduire l'espace abdominal disponible pour un repas par le sang peu de temps après l'alimentation par le sucre (Fikrig *et al.* 2020). Ainsi, les repas de jus sucré (composés de sucrose 10%) ont été considérés comme un inhibiteur de la prise de repas de sang chez *Ae. albopictus* et d'autres espèces de moustiques, réduisant sa taille et sa fréquence, réduisant les possibilités de transmission des agents pathogènes (Gary and Foster 2001; Braks *et al.* 2006). Par conséquent, les repas de jus sucrés constituent un comportement important des moustiques, qui a des répercussions sur la transmission des maladies et la lutte contre celles-ci (Peach and Gries 2020). Néanmoins, ce type de repas peut augmenter la survie des individus et donc, conduire à une plus longue période de transmission de potentiels pathogènes (Foster 1995; Braks *et al.* 2006; Xue *et al.* 2008; Qualls *et al.* 2013; Bellini *et al.* 2014; Kramer and Ciota 2015). De plus, la majorité des travaux sur *Ae. albopictus* ont été effectués sur des repas de jus sucrés non naturels, et non sur plantes directement. D'autres études sont donc nécessaires pour démêler les liens entre alimentation végétale et transmission de pathogènes chez *Ae. albopictus*.

Enfin, l'effet des fruits en décomposition constitue également une source de jus sucré pour les moustiques. Or, ces fruits peuvent contenir des composés phénoliques, des flavonoïdes, et des anthocyanes (Sha *et al.* 2023), autant de composés actifs qui peuvent potentiellement modifier le microbiote des moustiques et donc, leur compétence vectorielle pour les arbovirus. Cet aspect a été étudié dans le cadre du couple *Anopheles/Plasmodium* (Hien *et al.* 2016) mais mérite d'être abordé chez *Ae. albopictus* également.

Les travaux de cette thèse ont permis de démontrer une nouvelle fois que les conditions environnementales ont un impact sur la physiologie et la compétence vectorielle des hôtes. Il faudrait désormais s'intéresser à la diète des mollusques *B. truncatus* et *G. truncatula* et au microbiote d'*Ae. albopictus*.

En fin de compte, comme souvent dans la recherche, cette thèse a apporté des réponses à certaines questions tout en en soulevant au moins deux fois plus. En effet, chaque résultat obtenu

conduit à de nombreuses nouvelles hypothèses. En outre, chaque modèle étudié dans ce sujet aurait pu constituer une thèse à part entière pour lesquelles on pourrait allier des approches de terrain afin de tester des hypothèses puis de laboratoire afin de confirmer ou non ces dernières. Cependant, ce travail m'a permis de combiner ces trois modèles avec leurs techniques spécifiques, ainsi que d'intégrer des recherches sur le terrain, des expériences en laboratoire, et une initiation à la bio-informatique.

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail de thèse ont permis de démontrer l'importance des facteurs environnementaux sur, d'une part, le microbiote des hôtes et d'autre part, sur leur compétence vectorielle. Le premier lien, entre facteurs environnementaux et microbiote, a été établi en conditions naturelles, sur les modèles mollusques *B. truncatus* et *G. truncatula*, tandis que le lien entre facteurs environnementaux et compétence vectorielle a été démontré, en laboratoire, sur le modèle moustique *Ae. albopictus*.

Ces résultats ont contribué à la description des communautés bactériennes associées à des populations naturelles de *B. truncatus* et *G. truncatula*, ainsi qu'à caractériser la structure spatiale pour le premier et la dynamique temporelle pour le second. Nous avons également évalué l'influence de l'environnement et de la génétique des hôtes sur ces communautés. Toutefois, nous n'avons pas pu établir de lien entre ces microbiotes bactériens et des niveaux de compétences élevés ou faibles. Par conséquent, deux perspectives intéressantes s'ouvrent pour ces modèles mollusques : la première consiste à d'étudier les autres compartiments du microbiote afin d'identifier de potentiels liens avec la compétence; la seconde est d'examiner cette compétence en laboratoire, dans le cadre d'infestations expérimentales avec ou sans perturbation du microbiote. Ces deux approches devraient fournir de nouvelles connaissances sur le lien entre microbiote et compétence vectorielle des mollusques d'eau douce.

Concernant *Ae. albopictus*, ces travaux sont les premiers à évaluer un potentiel lien entre différents types de diète et compétence vectorielle. Nos résultats comblent partiellement le manque de connaissance sur ces aspects négligés de la biologie des moustiques. Pour aller plus loin, il serait nécessaire de répéter l'expérience conduite non seulement avec des moustiques d'élevage pour renforcer nos résultats; mais également avec des moustiques de terrain afin de vérifier si les résultats sont similaires.

L'approfondissement des divers résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse sur le lien entre facteurs environnementaux, ressources alimentaires, microbiote et compétence vectorielle des hôtes pourrait permettre d'identifier des conditions environnementales favorables, ou à l'inverse, défavorables à la transmission. Ces éléments pourraient être intégrés dans des modèles de dynamique de transmission et de compétence vectorielle des mollusques et des moustiques. Ces modèles permettraient de quantifier les changements environnementaux ayant un impact sur la compétence vectorielle et donc, d'identifier les zones où le risque d'émergence est élevé. Une fois identifiées, ces zones pourraient être surveillées afin de réduire le risque épidémiologique.

Références

- Abe EM, Guo Y-H, Shen H, *et al.* 2018. Phylogeography of *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) (Gastropoda: Planorbidae) in Selected African Countries. *Trop Med Infect Dis* **3**: 127.
- Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, *et al.* 2021. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere* **6**: 10.1128/msphere.01202-20.
- Afelt A, Frutos R, and Devaux C. 2018. Bats, Coronaviruses, and Deforestation: Toward the Emergence of Novel Infectious Diseases? *Front Microbiol* **9**.
- Alba A, Vazquez AA, and Hurtrez-Boussès S. 2021. Towards the comprehension of fasciolosis (re-)emergence: an integrative overview. *Parasitology* **148**: 385–407.
- Alexander JE and Covich AP. 1991. Predation Risk and Avoidance Behavior in Two Freshwater Snails. *Biol Bull* **180**: 387–93.
- Alexander KA, Sanderson CE, Marathe M, *et al.* 2015. What Factors Might Have Led to the Emergence of Ebola in West Africa? *PLoS Negl Trop Dis* **9**: e0003652.

- Allan ERO, Tennessen JA, Sharpton TJ, and Blouin MS. 2018. Allelic Variation in a Single Genomic Region Alters the Microbiome of the Snail *Biomphalaria glabrata*. *J Hered* **109**: 604–9.
- Almeida A, Mitchell AL, Tarkowska A, and Finn RD. 2018. Benchmarking taxonomic assignments based on 16S rRNA gene profiling of the microbiota from commonly sampled environments. *GigaScience* **7**: giy054.
- Almire F, Terhzaz S, Terry S, *et al.* 2021. Sugar feeding protects against arboviral infection by enhancing gut immunity in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* **17**: e1009870.
- Alonso-Pernas P, Bartram S, Arias-Cordero EM, *et al.* 2017. In Vivo Isotopic Labeling of Symbiotic Bacteria Involved in Cellulose Degradation and Nitrogen Recycling within the Gut of the Forest Cockchafer (*Melolontha hippocastani*). *Front Microbiol* **8**.
- Alout H, Djègbè I, Chandre F, *et al.* 2014. Insecticide exposure impacts vector–parasite interactions in insecticide-resistant malaria vectors. *Proc R Soc B Biol Sci* **281**: 20140389.
- Andrade DC de, Jean S, Clavelou P, *et al.* 2010. Chronic pain associated with the Chikungunya Fever: long lasting burden of an acute illness. *BMC Infect Dis* **10**: 31.
- Appleton CC. 1978. Review of Literature on Abiotic Factors Influencing the Distribution and Life Cycles of Bilharziosis Intermediate Host Snails. *Malacol Rev.*
- Austin B. 2017. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **110**: 1247–56.
- Azar SR and Weaver SC. 2019. Vector Competence: What Has Zika Virus Taught Us? *Viruses* **11**: 867.
- Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, *et al.* 2022. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol* **20**: 193–205.
- Bakker JD. 2024. Applied Multivariate Statistics in R.
- Barreaux AMG, Barreaux P, Thievent K, and Koella JC. 2016. Larval environment influences vector competence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *MalariaWorld J* **7**: 8.
- Barredo E and DeGennaro M. 2020. Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. *Trends Parasitol* **36**: 473–84.
- Bassene H, Niang EHA, Fenollar F, *et al.* 2020. Role of plants in the transmission of *Asaia* sp., which potentially inhibit the Plasmodium sporogonic cycle in *Anopheles* mosquitoes. *Sci Rep* **10**: 7144.
- Becker JM, Ganatra AA, Kandie F, *et al.* 2020. Pesticide pollution in freshwater paves the way for schistosomiasis transmission. *Sci Rep* **10**: 3650.
- Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, *et al.* 2018. Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis* **65**: 199–216.
- Belfaiza M, Abrous M, Rondelaud D, *et al.* 2004. The use of Tetraphyll as food for snails increases the intensity of cercarial shedding in *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* **94**: 86–90.

- Bellini R, Puggioli A, Balestrino F, *et al.* 2014. Sugar administration to newly emerged *Aedes albopictus* males increases their survival probability and mating performance. *Acta Trop* **132**: S116–23.
- Bergmann GT, Bates ST, Eilers KG, *et al.* 2011. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. *Soil Biol Biochem* **43**: 1450–5.
- Besnard M, Lastère S, Teissier A, *et al.* 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* **19**: 20751.
- Bogale HN, Cannon MV, Keita K, *et al.* 2020. Relative contributions of various endogenous and exogenous factors to the mosquito microbiota. *Parasit Vectors* **13**: 619.
- Bohers C, Vazeille M, Bernaoui L, *et al.* 2024. *Aedes albopictus* is a competent vector of five arboviruses affecting human health, greater Paris, France, 2023. *Eurosurveillance* **29**: 2400271.
- Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, *et al.* 2012. Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. *PLoS Pathog* **8**: e1002742.
- Bonn D. 2006. How did chikungunya reach the Indian Ocean? *Lancet Infect Dis* **6**: 543.
- Brady C, Cleenwerck I, Venter S, *et al.* 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst Appl Microbiol* **36**: 309–19.
- Braks M a. H, Juliano SA, and Lounibos LP. 2006. Superior reproductive success on human blood without sugar is not limited to highly anthropophilic mosquito species. *Med Vet Entomol* **20**: 53–9.
- Bray JR and Curtis JT. 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr* **27**: 326–49.
- Briegel H. 1980. Determination of uric acid and hematin in a single sample of excreta from blood-fed insects. *Experientia* **36**: 1428–1428.
- Briegel H, Lea AO, and Klowden MJ. 1979. Hemoglobinometry as a Method for Measuring Blood Meal Sizes of Mosquitoes (Diptera: Culicidae)1. *J Med Entomol* **15**: 235–8.
- Brooks JP, Edwards DJ, Harwich MD, *et al.* 2015. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiol* **15**: 66.
- Brown DS. 2014. Freshwater Snails Of Africa And Their Medical Importance. London: CRC Press.

Brown JK. 2016. Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens. American Phytopathological Society.

Bush A, Lafferty K, Lotz J, and Shostak A. 1997. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *J Parasitol* **83**: 575–83.

Callahan BJ, McMurdie PJ, and Holmes SP. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* **11**: 2639–43.

Caminade C, Van Dijk J, Baylis M, and Williams D. 2015. Modelling recent and future climatic suitability for fasciolosis in Europe. *Geospatial Health* **9**: 301.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* **6**: 1621–4.

Caron Y, Rondelaud D, and Losson B. 2008. The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitol Res* **103**: 735–44.

Carrington LB, Tran BCN, Le NTH, et al. 2018. Field- and clinically derived estimates of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus transmission potential in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 361–6.

Carvajal-Lago L, Ruiz-López MJ, Figuerola J, and Martínez-de La Puente J. 2021. Implications of diet on mosquito life history traits and pathogen transmission. *Environ Res* **195**: 110893.

Chabanol E, Behrends V, Prévot G, et al. 2020. Antibiotic Treatment in *Anopheles coluzzii* Affects Carbon and Nitrogen Metabolism. *Pathogens* **9**: 679.

Chang C-S and Kao C-Y. 2019. Current understanding of the gut microbiota shaping mechanisms. *J Biomed Sci* **26**: 59.

Chernin E. 1960. Infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni* under bacteriologically sterile conditions. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* **105**: 292–6.

Chevalier C, Stojanović O, Colin DJ, et al. 2015. Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell* **163**: 1360–74.

Chiarello M, McCauley M, Villéger S, and Jackson CR. 2022. Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLOS ONE* **17**: e0264443.

Chimbari M and Madsen H. 2003. Predation on snails by an indigenous fish, *Sargochromis codringtonii*, in ponds in Zimbabwe. *Afr J Aquat Sci* **28**: 187–90.

Chipev NH. 1993. Decoy effect and host infection by miracidia within snail communities. *Parasitology* **106**: 265–76.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, and Savioli L. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* **77**: 41–51.

Christiansen-Jucht C, Parham PE, Saddler A, et al. 2014. Temperature during larval development and adult maintenance influences the survival of *Anopheles gambiae* s.s. *Parasit Vectors* **7**: 489.

- Chu KY and Dawood IK. 1970. Cercarial Production from *Biomphalaria alexandrina* Infected with *Schistosoma mansoni*. *Bull World Health Organ* **42**: 569–74.
- Civitello DJ, Fatima H, Johnson LR, *et al.* 2018. Bioenergetic theory predicts infection dynamics of human schistosomes in intermediate host snails across ecological gradients. *Ecol Lett* **21**: 692–701.
- Clarke J, Lim A, Gupte P, *et al.* 2024. A global dataset of publicly available dengue case count data. *Sci Data*.
- Clec'h WL, Nordmeyer S, Anderson TJC, and Chevalier FD. 2022. Snails, microbiomes, and schistosomes: a three-way interaction? *Trends Parasitol* **38**: 353–5.
- Coffey LL, Failloux A-B, and Weaver SC. 2014. Chikungunya Virus–Vector Interactions. *Viruses* **6**: 4628–63.
- Collantes F, Delgado JA, Alarcón-Elbal PM, *et al.* 2014. First confirmed outdoor winter reproductive activity of Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Europe. *An Biol*.
- Collen B, Whitton F, Dyer EE, *et al.* 2014. Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. *Glob Ecol Biogeogr* **23**: 40–51.
- Coon KL, Brown MR, and Strand MR. 2016. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Mol Ecol* **25**: 5806–26.
- Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, and Strand MR. 2014. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol* **23**: 2727–39.
- Correa AC, Escobar JS, Durand P, *et al.* 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evol Biol* **10**: 381.
- Cort WW, Hussey KL, and Ameel DJ. 1960. Studies on a Microsporidian Hyperparasite of Strigeoid Trematodes. I. Prevalence and Effect on the Parasitized Larval Trematodes. *J Parasitol* **46**: 317–26.
- Croucher NJ and Thomson NR. 2010. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* **13**: 619–24.
- Daisley BA, Chmiel JA, Pitek AP, *et al.* 2020. Missing Microbes in Bees: How Systematic Depletion of Key Symbionts Erodes Immunity. *Trends Microbiol* **28**: 1010–21.
- Dalesman S and Lukowiak K. 2010. Effect of acute exposure to low environmental calcium on respiration and locomotion in *Lymnaea stagnalis* (L.). *J Exp Biol* **213**: 1471–6.
- Dalesman S and Lukowiak K. 2012. How Stress Alters Memory in ‘Smart’ Snails. *PLOS ONE* **7**: e32334.
- David MR, Santos LMB dos, Vicente ACP, and Maciel-de-Freitas R. 2016. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **111**: 577–87.
- Davidson GL, Cienfuegos IA, and Dalesman S. 2024. Antibiotic-altered gut microbiota explain host memory plasticity and disrupt pace-of-life covariation for an aquatic snail. *ISME J* **18**: wrae078.

- Del Lesto I, De Liberato C, Casini R, *et al.* 2022. Is Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) going to become homodynamic in Southern Europe in the next decades due to climate change? *R Soc Open Sci* **9**: 220967.
- Delisle E, Rousseau C, Broche B, *et al.* 2015. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Eurosurveillance* **20**.
- Demian ES and Lutfy RG. 1966. Factors Affecting the Predation of *Marisa cornuarietis* on *Bulinus* (B.) truncatus, *Biomphalaria alexandrina* and *Lymnaea caillaudi*. *Oikos* **17**: 212–30.
- Dennison NJ, Saraiva RG, Cirimotich CM, *et al.* 2016. Functional genomic analyses of *Enterobacter*, *Anopheles* and *Plasmodium* reciprocal interactions that impact vector competence. *Malar J* **15**: 425.
- Deure T van der, Maes T, Huyse T, and Stensgaard A-S. 2024. Climate change could fuel urinary schistosomiasis transmission in Africa and Europe. *Glob Change Biol* **30**: e17434.
- Díaz-Sánchez S, Hernández-Jarguín A, Torina A, *et al.* 2018. Biotic and abiotic factors shape the microbiota of wild-caught populations of the arbovirus vector *Culicoides imicola*. *Insect Mol Biol* **27**: 847–61.
- Dickson LB, Jiolle D, Minard G, *et al.* 2017. Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector. *Sci Adv* **3**: e1700585.
- Douchet P, Gourbal B, Loker ES, and Rey O. 2023. *Schistosoma* transmission: scaling-up competence from hosts to ecosystems. *Trends Parasitol* **39**: 563–74.
- Dreyfuss G, Abrous M, Vignoles P, and Rondelaud D. 2004. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: vertical distribution of metacercariae on plants under natural conditions. *Parasitol Res* **94**: 70–3.
- Duan D-Y, Zhou H-M, and Cheng T-Y. 2020. Comparative analysis of microbial community in the whole body and midgut from fully engorged and unfed female adult *Melophagus ovinus*. *Med Vet Entomol* **34**: 215–24.
- Dubourg G, Lagier JC, Armougom F, *et al.* 2013. The gut microbiota of a patient with resistant tuberculosis is more comprehensively studied by culturomics than by metagenomics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**: 637–45.
- Ducarmon QR, Hornung BVH, Geelen AR, *et al.* 2020. Toward Standards in Clinical Microbiota Studies: Comparison of Three DNA Extraction Methods and Two Bioinformatic Pipelines. *mSystems* **5**: 10.1128/msystems.00547-19.
- Ducklow HW, Boyle PJ, Mangel PW, *et al.* 1979. Bacterial flora of the schistosome vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Appl Environ Microbiol* **38**: 667–72.
- Ducklow HW, Clausen K, and Mitchell R. 1981. Ecology of Bacterial Communities in the Schistosomiasis Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *Microb Ecol* **7**: 253–74.
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, *et al.* 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev Camb Philos Soc* **81**: 163–82.

- Duval L. 2020. Climate Change, Vector-Borne Diseases, and Migration. In: Zimmermann KF (Ed). Handbook of Labor, Human Resources and Population Economics. Cham: Springer International Publishing.
- Ebrahimi B, Jackson BT, Guseman JL, *et al.* 2018. Alteration of plant species assemblages can decrease the transmission potential of malaria mosquitoes. *J Appl Ecol* **55**: 841–51.
- ECDC. 2017. Clusters of autochthonous chikungunya cases in Italy, first update, 9 Oct 2017.
- Emery O, Schmidt K, and Engel P. 2017. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Mol Ecol* **26**: 2576–90.
- Esquivel CJ, Cassone BJ, and Piermarini PM. 2014. Transcriptomic Evidence for a Dramatic Functional Transition of the Malpighian Tubules after a Blood Meal in the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: e2929.
- Ezeakacha NF and Yee DA. 2019. The role of temperature in affecting carry-over effects and larval competition in the globally invasive mosquito *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors* **12**: 123.
- Failloux A-B, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, and Rhodain F. 1999. Contrôle génétique de la compétence vectorielle des moustiques du genre *Aedes*.
- Fallet M, Montagnani C, Petton B, *et al.* 2022. Early life microbial exposures shape the *Crassostrea gigas* immune system for lifelong and intergenerational disease protection. *Microbiome* **10**: 85.
- Farghaly A, Saleh AA, Mahdy S, *et al.* 2016. Molecular approach for detecting early prepatent *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria alexandrina* snail host. *J Parasit Dis Off Organ Indian Soc Parasitol* **40**: 805–12.
- Farikou O, Njiokou F, Mbida Mbida JA, *et al.* 2010. Tripartite interactions between tsetse flies, *Sodalis glossinidius* and trypanosomes—An epidemiological approach in two historical human African trypanosomiasis foci in Cameroon. *Infect Genet Evol* **10**: 115–21.
- Fasolo A, Deb S, Stevanato P, *et al.* 2024. ASV vs OTUs clustering: Effects on alpha, beta, and gamma diversities in microbiome metabarcoding studies. *PLOS ONE* **19**: e0309065.
- Feinstein LM, Sul WJ, and Blackwood CB. 2009. Assessment of Bias Associated with Incomplete Extraction of Microbial DNA from Soil. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5428–33.
- Feng Y, Peng Y, Song X, *et al.* 2022. Anopheline mosquitoes are protected against parasite infection by tryptophan catabolism in gut microbiota. *Nat Microbiol* **7**: 707–15.
- Ferguson HM and Read AF. 2002. Genetic and environmental determinants of malaria parasite virulence in mosquitoes. *Proc R Soc B Biol Sci* **269**: 1217.
- Ferguson HM and Read AF. 2004. Mosquito appetite for blood is stimulated by *Plasmodium chabaudi* infections in themselves and their vertebrate hosts. *Malar J* **3**: 12.
- Fikrig K, Peck S, Deckerman P, *et al.* 2020. Sugar feeding patterns of New York *Aedes albopictus* mosquitoes are affected by saturation deficit, flowers, and host seeking. *PLoS Negl Trop Dis* **14**: e0008244.

- Flores HA, Taneja De Bruyne J, O'Donnell TB, *et al.* 2020. Multiple Wolbachia strains provide comparative levels of protection against dengue virus infection in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* **16**: e1008433.
- Formenti F, Cortés A, Deiana M, *et al.* 2023. The Human Blood Fluke, *Schistosoma mansoni*, Harbors Bacteria Throughout the Parasite's Life Cycle. *J Infect Dis* **228**: 1299–303.
- Foster WA. 1995. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. *Annu Rev Entomol* **40**: 443–74.
- Foster W a. 2022. Chapter 7: Behavioural ecology of plant-mosquito relations. Sensory ecology of disease vectors. Wageningen Academic Publishers.
- Foster WA. 2024. Mosquito pollination of plants: an overview of their role and an assessment of the possible contribution of disease vectors. *Transgenic Res*.
- Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, *et al.* 2011. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* **17**: 880–2.
- Fundación iO. 2022. Septiembre 2022. ¿Caso de dengue autóctono en Cataluña? <https://fundacionio.com/septiembre-2022-caso-de-dengue-autoctono-en-cataluna/>. Viewed 22 Oct 2024.
- Galinier R, Roger E, Moné Y, *et al.* 2017. A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* **11**: e0005398.
- Gall CA, Reif KE, Scoles GA, *et al.* 2016. The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. *ISME J* **10**: 1846–55.
- Gao H, Cui C, Wang L, *et al.* 2019. Mosquito Microbiota and Implications for Disease Control. *Trends Parasitol* **36**: 98.
- Gardner CL and Ryman KD. 2010. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med* **30**: 237–60.
- Garrido M, Veiga J, Garrigós M, and Martínez-de la Puente J. 2023. The interplay between vector microbial community and pathogen transmission on the invasive Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*: current knowledge and future directions. *Front Microbiol* **14**: 1208633.
- Gary RE Jr and Foster WA. 2001. Effects of Available Sugar on the Reproductive Fitness and Vectorial Capacity of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **38**: 22–8.
- Gendrin M, Rodgers FH, Yerbanga RS, *et al.* 2015. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat Commun* **6**: 5921.
- Gendrin M, Yerbanga RS, Ouedraogo JB, *et al.* 2016. Differential Effects of Azithromycin, Doxycycline, and Cotrimoxazole in Ingested Blood on the Vectorial Capacity of Malaria Mosquitoes. *Open Forum Infect Dis* **3**: ofw074.
- Gilbert MTP, Rambaut A, Wlasiuk G, *et al.* 2007. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 18566–70.

- Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, and Egozcue JJ. 2017. Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front Microbiol* **8**.
- Gorokhova E. 2005. Effects of preservation and storage of microcrustaceans in RNAlater on RNA and DNA degradation. *Limnol Oceanogr Methods* **3**: 143–8.
- Gould EA, Gallian P, Lamballerie X de, and Charrel RN. 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* **16**: 1702–4.
- Grandadam M, Caro V, Plumet S, *et al.* 2011. Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerg Infect Dis* **17**: 910–3.
- Grigaltchik VS, Webb C, and Seebacher F. 2016. Temperature modulates the effects of predation and competition on mosquito larvae. *Ecol Entomol* **41**: 668–75.
- Gu W, Müller G, Schlein Y, *et al.* 2011. Natural Plant Sugar Sources of Anopheles Mosquitoes Strongly Impact Malaria Transmission Potential. *PLOS ONE* **6**: e15996.
- Gu W, Unnasch TR, Katholi CR, *et al.* 2008. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**: 817–22.
- Guégan M, Tran Van V, Martin E, *et al.* 2020. Who is eating fructose within the *Aedes albopictus* gut microbiota? *Environ Microbiol* **22**: 1193–206.
- Guégan M, Zouache K, Démichel C, *et al.* 2018. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* **6**: 49.
- Guisso E, Waite JL, Jones M, *et al.* 2021. A non-destructive sugar-feeding assay for parasite detection and estimating the extrinsic incubation period of Plasmodium falciparum in individual mosquito vectors. *Sci Rep* **11**: 9344.
- Gupta KK, Prejneshu M, Aggarwal M, *et al.* 2021. A strategy to decrease vectorial competence of dengue mosquito Aedes aegypti by alteration of its gut microbiota using Indian traditional medicinal plants. *Int J Trop Insect Sci* **41**: 2947–56.
- Haas BJ, Gevers D, Earl AM, *et al.* 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* **21**: 494–504.
- Halstead NT, Hoover CM, Arakala A, *et al.* 2018. Agrochemicals increase risk of human schistosomiasis by supporting higher densities of intermediate hosts. *Nat Commun* **9**: 837.
- Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, and Reeves WC. 1983. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. *Annu Rev Entomol* **28**: 229–62.
- Herrero-Martínez J-M, Sánchez-Ledesma M, and Ramos-Rincón J-M. 2023. Imported and autochthonous dengue in Spain. *Rev Clínica Esp Engl Ed* **223**: 510–9.
- Hien DFDS, Dabiré KR, Roche B, *et al.* 2016. Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria. *PLoS Pathog* **12**: e1005773.
- Hien DFDS, Paré PSL, Cooper A, *et al.* 2021. Contrasting effects of the alkaloid ricinine on the capacity of Anopheles gambiae and Anopheles coluzzii to transmit Plasmodium falciparum. *Parasit Vectors* **14**: 479.

- Holtfreter MC, Moné H, Müller-Stöver I, *et al.* 2014. Schistosoma haematobium infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Eurosurveillance* **19**: 20821.
- Hong S, Bunge J, Leslin C, *et al.* 2009. Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J* **3**: 1365–73.
- Horton AA, Newbold LK, Palacio-Cortés AM, *et al.* 2020. Accumulation of polybrominated diphenyl ethers and microbiome response in the great pond snail *Lymnaea stagnalis* with exposure to nylon (polyamide) microplastics. *Ecotoxicol Environ Saf* **188**: 109882.
- Houseman JG and Downe AER. 1986. METHODS OF MEASURING BLOOD MEAL SIZE AND PROTEINASE ACTIVITY FOR DETERMINING EFFECTS OF MATED STATE ON DIGESTIVE PROCESSES OF FEMALE *AEDES AEGYPTI* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE). *Can Entomol* **118**: 241–8.
- Hunter RD. 1980. Effects of grazing on the quantity and quality of freshwater Aufwuchs. *Hydrobiologia* **69**: 251–9.
- Huot C, Clerissi C, Gourbal B, *et al.* 2020. Schistosomiasis Vector Snails and Their Microbiota Display a Phylosymbiosis Pattern. *Front Microbiol* **10**: 3092.
- Hurk AF van den, Johnson PH, Hall-Mendelin S, *et al.* 2007. Expectoration of Flaviviruses During Sugar Feeding by Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **44**: 845–50.
- Hurtrez-Boussès S, Meunier C, Durand P, and Renaud F. 2001. Dynamics of host–parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes Infect* **3**: 841–9.
- Iii JOF. 2013. Ecology of Nontuberculous Mycobacteria—Where Do Human Infections Come from? *Semin Respir Crit Care Med* **34**: 95–102.
- Infantes LRR-H, Yataco GAP, Ortiz-Martínez Y, *et al.* 2023. The global prevalence of human fascioliasis: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Infect Dis* **10**: 20499361231185413.
- Istituto Superiore di Sanità. Arbovirosi news 2023. <https://www.epicentro.iss.it/arbovirosi/2023>. Viewed 22 Oct 2024.
- Jaccard P. 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. *Bull Société Vaudoise Sci Nat* **37**: 547.
- Johnson SG, Lively CM, and Schrag SJ. 1997. Evolution and ecological correlates of uniparental and biparental reproduction in freshwater snails. In: Streit B, Städler T, Lively CM (Eds). *Evolutionary Ecology of Freshwater Animals: Concepts and Case Studies*. Basel: Birkhäuser.
- Josseran L, Paquet C, Zehgnoun A, *et al.* 2006. Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island. *Emerg Infect Dis* **12**: 1994–5.
- Jurado-Rivera JA, Vogler AP, Reid CAM, *et al.* 2008. DNA barcoding insect–host plant associations. *Proc R Soc B Biol Sci* **276**: 639–48.
- Kanagawa T. 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng* **96**: 317–23.
- Kariuki HC, Clennon JA, Brady MS, *et al.* 2004. Distribution patterns and cercarial shedding of *Bulinus nasutus* and other snails in the Msambweni area, Coast Province, Kenya.

- Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, *et al.* 2016. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol* **32**: 458–69.
- Kennedy SR, Tsau S, Gillespie R, and Krehenwinkel H. 2020. Are you what you eat? A highly transient and prey-influenced gut microbiome in the grey house spider *Badumna longinqua*. *Mol Ecol* **29**: 1001–15.
- Kenney A, Cusick A, Payne J, *et al.* 2017. The potential for flower nectar to allow mosquito to mosquito transmission of *Francisella tularensis*. *PLoS ONE* **12**: e0175157.
- Kramer LD and Ciota AT. 2015. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol* **15**: 112–8.
- Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, *et al.* 2014. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**: a019760.
- Lahondère C, Vinauger C, Okubo RP, *et al.* 2020. The olfactory basis of orchid pollination by mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci* **117**: 708–16.
- Lai PF and Canning EU. 1979. Infectivity of a microsporidium of mosquitoes (*Nosema algerae*) to larval stages of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. 1979.
- Lambrechts L. 2010. Dissecting the Genetic Architecture of Host–Pathogen Specificity. *PLoS Pathog* **6**: e1001019.
- Lambrechts L, Chavatte J-M, Snounou G, and Koella JC. 2006. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. *Proc R Soc B Biol Sci* **273**: 1501.
- Laverdeur J, Desmecht D, Hayette M-P, and Darcis G. 2024. Dengue and chikungunya: future threats for Northern Europe? *Front Epidemiol* **4**: 1342723.
- Lee CK, Herbold CW, Polson SW, *et al.* 2012. Groundtruthing Next-Gen Sequencing for Microbial Ecology–Biases and Errors in Community Structure Estimates from PCR Amplicon Pyrosequencing. *PLoS ONE* **7**: e44224.
- Lefevre T, Ohm J, Dabiré KR, *et al.* 2018. Transmission traits of malaria parasites within the mosquito: Genetic variation, phenotypic plasticity, and consequences for control. *Evol Appl* **11**: 456–69.
- Lefèvre T, Vantoux A, Dabiré KR, *et al.* 2013. Non-Genetic Determinants of Mosquito Competence for Malaria Parasites. *PLoS Pathog* **9**: e1003365.
- Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, *et al.* 2014. Chikungunya in the Americas. *The Lancet* **383**: 514.
- Levi JE. 2016. Dengue Virus and Blood Transfusion. *J Infect Dis* **213**: 689–90.
- Lewis J, Gallichotte EN, Randall J, *et al.* 2023. Intrinsic factors driving mosquito vector competence and viral evolution: a review. *Front Cell Infect Microbiol* **13**.
- Li R, Tun HM, Jahan M, *et al.* 2017. Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Sci Rep* **7**: 5752.

- Liberti J and Engel P. 2020. The gut microbiota — brain axis of insects. *Curr Opin Insect Sci* **39**: 6–13.
- Liddon J and Dalesman S. 2015. Trail following differs between wild and captive-reared snails, *Lymnaea stagnalis*. *J Molluscan Stud* **81**: 299–302.
- Lima Cavalcanti TYV de, Pereira MR, Paula SO de, and Franca RF de O. 2022. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. *Viruses* **14**: 969.
- Linenberg I, Christophides GK, and Gendrin M. 2016. Larval diet affects mosquito development and permissiveness to Plasmodium infection. *Sci Rep* **6**: 38230.
- Louca V, Lucas MC, Green C, *et al.* 2009. Role of Fish as Predators of Mosquito Larvae on the Floodplain of the Gambia River. *J Med Entomol* **46**: 546–56.
- Louradour I, Monteiro CC, Inbar E, *et al.* 2017. The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for Leishmania major. *Cell Microbiol* **19**: e12755.
- Lowe A, Jones L, Witter L, *et al.* 2022. Using DNA Metabarcoding to Identify Floral Visitation by Pollinators. *Diversity* **14**: 236.
- Lukowiak K, Orr M, Caigny P de, *et al.* 2010. Ecologically relevant stressors modify long-term memory formation in a model system. *Behav Brain Res* **214**: 18–24.
- Luo J, Cheng Y, Guo L, *et al.* 2021. Variation of gut microbiota caused by an imbalance diet is detrimental to bugs' survival. *Sci Total Environ* **771**: 144880.
- Maciver SK, Piñero JE, and Lorenzo-Morales J. 2020. Is *Naegleria fowleri* an Emerging Parasite? *Trends Parasitol* **36**: 19–28.
- Manea L and Alexandrescu DC. 2013. STUDIES ON THE CONTENT OF METALS AND PESTICIDES IN FRUIT GROWING AREAS AND THEIR ECOTOXICOLOGICAL IMPACT. *Rev Roum Chim*.
- Marchesi JR and Ravel J. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* **3**: 31.
- Martin LB, Burgan SC, Adelman JS, and Gervasi SS. 2016. Host Competence: An Organismal Trait to Integrate Immunology and Epidemiology. *Integr Comp Biol* **56**: 1225–37.
- Martínez-Ortí, A., Bagues MD, Unidad de Parasitología Sanitaria, Fac. de Farmacia, Univ. de València, Spain, *et al.* 2015. Dos nuevas localizaciones para España de *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) (Gastropoda, Planorbidae), hospedador intermediario de Schistosomiasis urinaria. *Arx Miscel·lània Zoològica* **13**: 25–31.
- McCann P, McFarland C, Megaw J, *et al.* 2024. Assessing the microbiota of the snail intermediate host of trematodes, *Galba truncatula*. *Parasit Vectors* **17**: 31.
- McMichael C. 2015. Climate change-related migration and infectious disease. *Virulence* **6**: 548–53.
- Medini D, Serruto D, Parkhill J, *et al.* 2008. Microbiology in the post-genomic era. *Nat Rev Microbiol* **6**: 419–30.

- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, *et al.* 2012. A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **12**: 435–47.
- Merrill TES and Johnson PTJ. 2020. Towards a mechanistic understanding of competence: a missing link in diversity–disease research. *Parasitology* **147**: 1159–70.
- Minard G, Mavingui P, and Moro CV. 2013a. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors* **6**: 146.
- Minard G, Tran FH, Raharimalala FN, *et al.* 2013b. Prevalence, genomic and metabolic profiles of cinetobacter and saia associated with field-caught edes albopictus from Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 63–73.
- Minard G, Tran F-H, Van VT, *et al.* 2018. Shared larval rearing environment, sex, female size and genetic diversity shape Ae. albopictus bacterial microbiota. *PLOS ONE* **13**: e0194521.
- Mitta G, Adema CM, Gourbal B, *et al.* 2012. Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. *Dev Comp Immunol* **37**: 1–8.
- Mizushima D, Yamamoto DS, Tabbabi A, *et al.* 2023. A rare sugar, allose, inhibits the development of Plasmodium parasites in the Anopheles mosquito independently of midgut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* **13**.
- Moazeni M and Ahmadi A. 2016. Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol* **169**: 81–9.
- Moller-Jacobs LL, Murdock CC, and Thomas MB. 2014. Capacity of mosquitoes to transmit malaria depends on larval environment. *Parasit Vectors* **7**: 593.
- Mordecai EA, Caldwell JM, Grossman MK, *et al.* 2019. Thermal biology of mosquito-borne disease. *Ecol Lett* **22**: 1690.
- Mouahid A and Mone H. 1990. Interference of Echinoparyphium elegans with the host-parasite system Bulinus truncatus—Schistosoma bovis in natural conditions. *Ann Trop Med Parasitol* **84**: 341–8.
- Mukherjee D, Das S, Begum F, *et al.* 2019. The Mosquito Immune System and the Life of Dengue Virus: What We Know and Do Not Know. *Pathogens* **8**: 77.
- Munster M van. 2020. Impact of Abiotic Stresses on Plant Virus Transmission by Aphids. *Viruses* **12**: 216.
- Murdock CC, Paaijmans KP, Bell AS, *et al.* 2012. Complex effects of temperature on mosquito immune function. *Proc R Soc B Biol Sci* **279**: 3357–66.
- Murrieta RA, Garcia-Luna SM, Murrieta DJ, *et al.* 2021. Impact of extrinsic incubation temperature on natural selection during Zika virus infection of Aedes aegypti and Aedes albopictus. *PLOS Pathog* **17**: e1009433.
- Muturi EJ and Alto BW. 2011. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter Aedes aegypti competence for arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N* **11**: 1157–63.
- Muturi EJ, Blackshear Jr. M, and Montgomery A. 2012. Temperature and density-dependent effects of larval environment on Aedes aegypti competence for an alphavirus. *J Vector Ecol* **37**: 154–61.

- Muturi EJ, Costanzo K, Kesavaraju B, and Alto BW. 2011. Can Pesticides and Larval Competition Alter Susceptibility of Aedes Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Arbovirus Infection? *J Med Entomol* **48**: 429–36.
- Muturi EJ, Lagos-Kutz D, Dunlap C, *et al.* 2018. Mosquito microbiota cluster by host sampling location. *Parasit Vectors* **11**: 468.
- Nasir P and Erasmus DA. 1964. A Key to the Cercariae from British Freshwater Molluscs. *J Helminthol* **38**: 245.
- Ni H, Cai X, Ren J, *et al.* 2024. Epidemiological characteristics and transmission dynamics of dengue fever in China. *Nat Commun* **15**: 8060.
- Noden BH, Vaughan JA, Pumpuni CB, and Beier JC. 2011. Mosquito ingestion of antibodies against mosquito midgut microbiota improves conversion of ookinetes to oocysts for Plasmodium falciparum, but not P. yoelii. *Parasitol Int* **60**: 440–6.
- Noël H, Ruello M, Maccary A, *et al.* 2018. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect* **24**: 295–300.
- Nordmeyer SC, Anderson TJC, Chevalier FD, and Clec'h WL. 2024. Limited Impact of Schistosome Infection on Biomphalaria glabrata Snail Microbiomes. 2024.10.18.619126.
- Novakova E, Woodhams DC, Rodríguez-Ruano SM, *et al.* 2017. Mosquito Microbiome Dynamics, a Background for Prevalence and Seasonality of West Nile Virus. *Front Microbiol* **8**.
- Novelo M, Dutra HL, Metz HC, *et al.* 2023. Dengue and chikungunya virus loads in the mosquito Aedes aegypti are determined by distinct genetic architectures. *PLOS Pathog* **19**: e1011307.
- Nunes RD, Ventura-Martins G, Moretti DM, *et al.* 2016. Polyphenol-Rich Diets Exacerbate AMPK-Mediated Autophagy, Decreasing Proliferation of Mosquito Midgut Microbiota, and Extending Vector Lifespan. *PLoS Negl Trop Dis* **10**: e0005034.
- Nwoko OE, Mogaka JJO, and Chimbari MJ. 2021. Challenges and Opportunities Presented by Current Techniques for Detecting Schistosome Infections in Intermediate Host Snails: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health* **18**: 5403.
- Nyasembe VO, Tchouassi DP, Pirk CWW, *et al.* 2018. Host plant forensics and olfactory-based detection in Afro-tropical mosquito disease vectors. *PLoS Negl Trop Dis* **12**: e0006185.
- Oliveira S, Capinha C, and Rocha J. 2023. Predicting the time of arrival of the Tiger mosquito (Aedes albopictus) to new countries based on trade patterns of tyres and plants. *J Appl Ecol* **60**: 2362–74.
- Oliveira ALD, Da Silva D, Zanotti-Magalhaes EM, *et al.* 2008. Schistosome/mollusk: genetic compatibility. *Genet Mol Res* **7**: 518–26.
- Orr MV, El-Bekai M, Lui M, *et al.* 2007. Predator detection in Lymnaea stagnalis. *J Exp Biol* **210**: 4150–8.
- Paré PSL, Hien DFDS, Youba M, *et al.* 2024. The paradox of plant preference: The malaria vectors Anopheles gambiae and Anopheles coluzzii select suboptimal food sources for their survival and reproduction. *Ecol Evol* **14**: e11187.

- Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, and Pop M. 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods* **10**: 1200–2.
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, *et al.* 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* **11**: 1177–85.
- Peach DAH and Gries G. 2016. Nectar thieves or invited pollinators? A case study of tansy flowers and common house mosquitoes. *Arthropod-Plant Interact* **10**: 497–506.
- Peach DAH and Gries G. 2020. Mosquito phytophagy – sources exploited, ecological function, and evolutionary transition to haematophagy. *Entomol Exp Appl* **168**: 120–36.
- Pereira-dos-Santos T, Roiz D, Lourenço-de-Oliveira R, and Paupy C. 2020. A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses? *Pathogens* **9**: 266.
- Philip M, Nilsen T, Majaneva S, *et al.* 2024. A Targeted Reference Database for Improved Analysis of Environmental 16S rRNA Oxford Nanopore Sequencing Data.
- Pialoux G, Gaüzère B-A, Jauréguiberry S, and Strobel M. 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis* **7**: 319–27.
- Pierson TC and Diamond MS. 2018. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* **560**: 573–81.
- Pinowska A. 2002. Effects of snail grazing and nutrient release on growth of the macrophytes *Ceratophyllum demersum* and *Elodea canadensis* and the filamentous green alga *Cladophora* sp. *Hydrobiologia* **479**: 83–94.
- Pinto AJ and Raskin L. 2012. PCR Biases Distort Bacterial and Archaeal Community Structure in Pyrosequencing Datasets. *PLOS ONE* **7**: e43093.
- Plummer E, Twin J, Bulach DM, *et al.* 2015. A Comparison of Three Bioinformatics Pipelines for the Analysis of Preterm Gut Microbiota using 16S rRNA Gene Sequencing Data. *J Proteomics Bioinform* **8**: 1–9.
- Ponton F, Wilson K, Cotter SC, *et al.* 2011. Nutritional Immunology: A Multi-Dimensional Approach. *PLoS Pathog* **7**: e1002223.
- Portet A, Toulza E, Lokmer A, *et al.* 2021. Experimental Infection of the *Biomphalaria glabrata* Vector Snail by *Schistosoma mansoni* Parasites Drives Snail Microbiota Dysbiosis. *Microorganisms* **9**: 1084.
- Priyadarsini SL, Suresh M, and Huisingh D. 2020. What can we learn from previous pandemics to reduce the frequency of emerging infectious diseases like COVID-19? *Glob Transit* **2**: 202–20.
- Qualls WA, Xue RD, Beier JC, and Müller GC. 2013. Survivorship of adult *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) feeding on indoor ornamental plants with no inflorescence. *Parasitol Res* **112**: 2313–8.
- Quiroz-Martinez H and Rodriguez Castro V. 2007. Aquatic insects as predators of mosquito larvae. *J Am Mosq Control Assoc* **23**: 110–7.
- Ramirez JL, Souza-Neto J, Cosme RT, *et al.* 2012. Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1561.

- Rausch P, Rühlemann M, Hermes BM, *et al.* 2019. Comparative analysis of amplicon and metagenomic sequencing methods reveals key features in the evolution of animal metaorganisms. *Microbiome* **7**: 133.
- Regasa A and Seboka M. 2022. Review on Fasciolosis, its Effect on Meat Quality/Hazards and Economical Importance. **10**: 247.
- Reid AJ, Carlson AK, Creed IF, *et al.* 2019. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol Rev* **94**: 849–73.
- Rezza G. 2018. Chikungunya is back in Italy: 2007–2017. *J Travel Med* **25**.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, *et al.* 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet Lond Engl* **370**: 1840–6.
- Richards SL, Lord CC, Pesko KN, and Tabachnick WJ. 2010. Environmental and Biological Factors Influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Vector Competence for West Nile Virus. *Am J Trop Med Hyg* **83**: 126–34.
- Richards SL, White AV, and Balanay JAG. 2017. Potential for sublethal insecticide exposure to impact vector competence of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for dengue and Zika viruses. *Res Rep Trop Med* **8**: 53–7.
- Rodgers FH, Gendrin M, and Christophides GK. 2017a. Chapter 6 - The Mosquito Immune System and Its Interactions With the Microbiota: Implications for Disease Transmission. In: Wikel SK, Aksoy S, Dimopoulos G (Eds). *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission*, Volume 1. Academic Press.
- Rodgers FH, Gendrin M, Wyer CAS, and Christophides GK. 2017b. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLOS Pathog* **13**: e1006391.
- Rojas M, Monsalve DM, Pacheco Y, *et al.* 2020. Ebola virus disease: An emerging and re-emerging viral threat. *J Autoimmun* **106**: 102375.
- Roldán C, Begovoeva M, López-Olvera JR, *et al.* 2021. Endemic occurrence of *Fasciola hepatica* in an alpine ecosystem, Pyrenees, Northeastern Spain. *Transbound Emerg Dis* **68**: 2589–94.
- Rollinson D, Stothard JR, and Southgate VR. 2001. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. *Parasitology* **123**: 245–60.
- Romoli O and Gendrin M. 2018. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and *Plasmodium*. *Parasit Vectors* **11**: 200.
- Rondelaud D, Denève C, Belfaiza M, *et al.* 2004. Variability in the prevalence of infection and cercarial production in *Galba truncatula* raised on a high-quality diet. *Parasitol Res* **92**: 242–5.
- Rondelaud D, Hourdin P, Vignoles P, *et al.* 2011. The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. *Vet Parasitol* **181**: 166–73.

- Rondelaud D, Sanabria R, Vignoles P, *et al.* 2013. Fasciola hepatica: variations in redial development and cercarial production in relation to the geographic origin of the parasite. *Parasite* **20**: 33.
- Rose NH, Shepard JJ, and Ayala D. 2024. Establishing Colonies from Field-Collected Mosquitoes: Special Accommodations for Wild Strains. *Cold Spring Harb Protoc* **2024**: pdb.top107654.
- Rothe C, Zimmer T, Schunk M, *et al.* 2021. Developing Endemicity of Schistosomiasis, Corsica, France. *Emerg Infect Dis* **27**: 319–21.
- Ruche GL, Souarès Y, Armengaud A, *et al.* 2010. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance* **15**: 19676.
- Rumschlag SL, Halstead NT, Hoverman JT, *et al.* 2019. Effects of pesticides on exposure and susceptibility to parasites can be generalised to pesticide class and type in aquatic communities. *Ecol Lett* **22**: 962–72.
- Russell MC, Rappazzo KM, and Hoffman JC. 2023. Ecological Degradation and the Risk of Mosquito-Borne Disease in the Great Lakes Basin. *EcoHealth* **20**: 150–5.
- Salgado JFM, Premkrishnan BNV, Oliveira EL, *et al.* 2024. The dynamics of the midgut microbiome in Aedes aegypti during digestion reveal putative symbionts. *PNAS Nexus* **3**: pgae317.
- Salloum PM, Jorge F, and Poulin R. 2023. Different trematode parasites in the same snail host: Species-specific or shared microbiota? *Mol Ecol* **32**: 5414–28.
- Santé Publique France. 2022. Chikungunya, dengue et zika - Chikungunya, dengue et zika - Données de la surveillance renforcée en France métropolitaine en 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/chikungunya/articles/donnees-en-france-metropolitaine/chikungunya-dengue-et-zika-donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-france-metropolitaine-en-2022>. Viewed 22 Oct 2024.
- Santé Publique France. 2024. Chikungunya, dengue et zika - Données de la surveillance renforcée en France métropolitaine en 2023. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/chikungunya/articles/donnees-en-france-metropolitaine/chikungunya-dengue-et-zika-donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-france-metropolitaine-en-2023>. Viewed 22 Oct 2024.
- Sarma DK, Kumar M, Dhurve J, *et al.* 2022. Influence of Host Blood Meal Source on Gut Microbiota of Wild Caught Aedes aegypti, a Dominant Arboviral Disease Vector. *Microorganisms* **10**: 332.
- Schaller J. 2013. Invertebrate grazers are a crucial factor for grass litter mass loss and nutrient mobilization during aquatic decomposition. *Fundam Appl Limnol Arch Für Hydrobiol* **183**: 287–95.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, *et al.* 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537–41.
- Schmeller DS, Courchamp F, and Killeen G. 2020. Biodiversity loss, emerging pathogens and human health risks. *Biodivers Conserv* **29**: 3095–102.

- Schols R, Carolus H, Hammoud C, *et al.* 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* **113**: 722–9.
- Schols R, Vanoverberghe I, Huyse T, and Decaestecker E. 2023. Host-bacteriome transplants of the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata* reflect species-specific associations. *FEMS Microbiol Ecol* **99**: fiad101.
- Schrieke H, Maignien L, Constancias F, *et al.* 2022. The mosquito microbiome includes habitat-specific but rare symbionts. *Comput Struct Biotechnol J* **20**: 410–20.
- Schulenburg H, Kurtz J, Moret Y, and Siva-Jothy MT. 2008. Introduction. Ecological immunology. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **364**: 3.
- Scolari F, Casiraghi M, and Bonizzoni M. 2019. *Aedes* spp. and Their Microbiota: A Review. *Front Microbiol* **10**.
- Seabourn PS, Weber DE, Spafford H, and Medeiros MCI. 2023. *Aedes albopictus* microbiome derives from environmental sources and partitions across distinct host tissues. *MicrobiologyOpen* **12**: e1364.
- Šebesta O and Gelbič I. 2016. Late flooding combined with warm autumn — potential possibility for prolongation of transmission of mosquito-borne diseases. *Biologia (Bratisl)* **71**: 1292–7.
- Semenza JC and Paz S. 2021. Climate change and infectious disease in Europe: Impact, projection and adaptation. *Lancet Reg Health – Eur* **9**.
- Sene O, Sagne SN, Ngom D, *et al.* 2024. Emergence of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus in Eastern Senegal in 2022. *Viruses* **16**: 315.
- Sha SP, Modak D, Sarkar S, *et al.* 2023. Fruit waste: a current perspective for the sustainable production of pharmacological, nutraceutical, and bioactive resources. *Front Microbiol* **14**.
- Shaji Mathew J, Menon VP, Menon VP, *et al.* 2019. Dengue virus transmission from live donor liver graft. *Am J Transplant* **19**: 1838–46.
- Shannon DM, Richardson N, Lahondère C, and Peach D. 2024. Mosquito floral visitation and pollination. *Curr Opin Insect Sci* **65**: 101230.
- Shao Y, Arias-Cordero E, Guo H, *et al.* 2014. In Vivo Pyro-SIP Assessing Active Gut Microbiota of the Cotton Leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PLOS ONE* **9**: e85948.
- Shinoda N, Yoshida T, Kusama T, *et al.* 2009. High GC Contents of Primer 5'-End Increases Reaction Efficiency in Polymerase Chain Reaction. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **28**: 324–30.
- Sierra MA, Li Q, Pushalkar S, *et al.* 2020. The Influences of Bioinformatics Tools and Reference Databases in Analyzing the Human Oral Microbial Community. *Genes* **11**: 878.
- Silva Pessoa Vieira CJ da, Steiner São Bernardo C, Ferreira da Silva DJ, *et al.* 2022. Land-use effects on mosquito biodiversity and potential arbovirus emergence in the Southern Amazon, Brazil. *Transbound Emerg Dis* **69**: 1770–81.

- Silva TM, Melo ES, Lopes AC, *et al.* 2013. Characterization of the bacterial microbiota of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda) from Brazil. *Lett Appl Microbiol* **57**: 19–25.
- Simon V, Sampaio Silva X, Ramajo M, and Conceicao A. 1974. Susceptibility of *Bulinus truncatus* from Portugal and other origins to a strain of *Schistosoma bovis* of Salamanca (Spain). *Rev Iber Parasitol.*
- Singh AK, Kaur R, Verma S, and Singh S. 2022. Antimicrobials and Antibiotic Resistance Genes in Water Bodies: Pollution, Risk, and Control. *Front Environ Sci* **10**.
- Siriyasatien P, Chadsuthi S, Jampachaisri K, and Kesorn K. 2018. Dengue Epidemics Prediction: A Survey of the State-of-the-Art Based on Data Science Processes. *IEEE Access* **6**: 53757–95.
- Sokolow SH, Jones IJ, Jocque M, *et al.* 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 B Biol Sci* **372**: 20160127.
- Soliman MFM. 2008. Epidemiological review of human and animal fascioliasis in Egypt. *J Infect Dev Ctries* **2**: 182–9.
- Somé BM, Guissou E, Da DF, *et al.* 2024. Mosquito ageing modulates the development, virulence and transmission potential of pathogens. *Proc R Soc B Biol Sci* **291**: 20232097.
- Sommer F, Ståhlman M, Ilkayeva O, *et al.* 2016. The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus arctos*. *Cell Rep* **14**: 1655–61.
- Spernovasilis N, Tsiodras S, and Poulakou G. 2022. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: Humankind's Companions and Competitors. *Microorganisms* **10**: 98.
- Stone CM, Jackson BT, and Foster WA. 2012. Effects of Plant-Community Composition on the Vectorial Capacity and Fitness of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Am J Trop Med Hyg* **87**: 727–36.
- Strand MR. 2018. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. *Curr Opin Insect Sci* **28**: 59–65.
- Sun X, Hong J, Ding T, *et al.* 2024. Snail microbiota and snail-schistosome interactions: axenic and gnotobiotic technologies. *Trends Parasitol* **40**: 241–56.
- Suntsov VV. 2015. The origin and worldwide expansion of the plague agent *Yersinia pestis*: The isolation factor. *Biol Bull Rev* **5**: 166–78.
- Teichmann D, Grobusch MP, Göbels K, *et al.* 2000. Acute Fascioliasis with Multiple Liver Abscesses. *Scand J Infect Dis* **32**: 558–60.
- Tenywa FC, Musa JJ, Musiba RM, *et al.* 2024. Sugar and blood: the nutritional priorities of the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors* **17**: 26.
- Thijs S, Op De Beeck M, Beckers B, *et al.* 2017. Comparative Evaluation of Four Bacteria-Specific Primer Pairs for 16S rRNA Gene Surveys. *Front Microbiol* **8**.
- Tjaden NB, Cheng Y, Beierkuhnlein C, and Thomas SM. 2021. Chikungunya Beyond the Tropics: Where and When Do We Expect Disease Transmission in Europe? *Viruses* **13**: 1024.

- Trouve S, Degen L, and Goudet J. 2005. Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail *Galba truncatula*. *J Evol Biol* **18**: 358–70.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, and Higgs S. 2007. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLOS Pathog* **3**: e201.
- Tsui JL-H, Pena RE, Moir M, *et al.* 2024. Impacts of climate change-related human migration on infectious diseases. *Nat Clim Change* **14**: 793–802.
- Tucker MS, Lewis FA, Driver JD, and Granath WO. 2014. Determination and Quantification of *Schistosoma mansoni* Cercarial Emergence from *Biomphalaria glabrata* Snails. *J Parasitol* **100**: 778–83.
- Turner AM. 2008. Predator diet and prey behaviour: freshwater snails discriminate among closely related prey in a predator's diet. *Anim Behav* **76**: 1211–7.
- Unlu I, Farajollahi A, Strickman D, and Fonseca DM. 2013. Crouching Tiger, Hidden Trouble: Urban Sources of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Refractory to Source-Reduction. *PLoS ONE* **8**: e77999.
- Upshur IF, Fehlman M, Parikh V, *et al.* 2023. Sugar feeding by invasive mosquito species on ornamental and wild plants. *Sci Rep* **13**: 22121.
- Vandekerckhove O, De Buck E, and Van Wijngaerden E. 2021. Lyme disease in Western Europe: an emerging problem? A systematic review. *Acta Clin Belg* **76**: 244–52.
- Vantaux A, Lefèvre T, Cohuet A, *et al.* 2016a. Larval nutritional stress affects vector life history traits and human malaria transmission. *Sci Rep* **6**: 36778.
- Vantaux A, Ouattarra I, Lefèvre T, and Dabiré KR. 2016b. Effects of larvicidal and larval nutritional stresses on *Anopheles gambiae* development, survival and competence for *Plasmodium falciparum*. *Parasit Vectors* **9**: 226.
- Vareille-Morel C, Dreyfuss G, and Rondelaud D. 1999. The characteristics of habitats colonized by three species of *Lymnaea* (Mollusca) in swampy meadows on acid soil : their interest for control of fasciolosis. *Ann Limnol - Int J Limnol* **35**: 173–8.
- Vázquez AA, Alba A, Alda P, *et al.* 2023. Lymnaeid Snails and the Transmission of Fasciolosis: Understanding the Differential Risks from Local to Global Scale. In: Vinarski MV, Vázquez AA (Eds). *The Lymnaeidae: A Handbook on Their Natural History and Parasitological Significance*. Cham: Springer International Publishing.
- Vázquez AA, Sabourin E, Alda P, *et al.* 2021. Genetic diversity and relationships of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda) with native and introduced definitive and intermediate hosts. *Transbound Emerg Dis* **68**: 2274–86.
- Vega-Rúa A, Marconcini M, Madec Y, *et al.* 2020. Vector competence of *Aedes albopictus* populations for chikungunya virus is shaped by their demographic history. *Commun Biol* **3**: 1–13.
- Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, *et al.* 2016. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet* **387**: 228.

- Venturi G, Luca MD, Fortuna C, *et al.* 2017. Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Eurosurveillance* **22**: 17.
- Viglietta M, Bellone R, Blisnick AA, and Failloux A-B. 2021. Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Front Microbiol* **12**.
- Wang M, An Y, Gao L, *et al.* 2021. Glucose-mediated proliferation of a gut commensal bacterium promotes Plasmodium infection by increasing mosquito midgut pH. *Cell Rep* **35**: 108992.
- Wang H, Liu C, Liu Z, *et al.* 2020. The different dietary sugars modulate the composition of the gut microbiota in honeybee during overwintering. *BMC Microbiol* **20**: 61.
- Whitehouse CA and Hottel HE. 2007. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Mol Cell Probes* **21**: 92–6.
- Wilkman L, Ahlm C, Evander M, and Lwande OW. 2023. Mosquito-borne viruses causing human disease in Fennoscandia—Past, current, and future perspectives. *Front Med* **10**.
- Williams JC, Hagedorn HH, and Beyenbach KW. 1983. Dynamic changes in flow rate and composition of urine during the post-bloodmeal diuresis in *Aedes aegypti* (L.). *J Comp Physiol* **153**: 257–65.
- Wilson AJ, Morgan ER, Booth M, *et al.* 2017. What is a vector? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **372**: 20160085.
- Wiroonpan P, Chontanarith T, and Purivirojkul W. 2021. Cercarial trematodes in freshwater snails from Bangkok, Thailand: prevalence, morphological and molecular studies and human parasite perspective. *Parasitology* **148**: 366–83.
- Wong AC-N, Dobson AJ, and Douglas AE. 2014. Gut microbiota dictates the metabolic response of *Drosophila* to diet. *J Exp Biol* **217**: 1894–901.
- Wu VY, Chen B, Christofferson R, *et al.* 2022. A minimum data standard for vector competence experiments. *Sci Data* **9**: 634.
- Wu X, Tian H, Zhou S, *et al.* 2014. Impact of global change on transmission of human infectious diseases. *Sci China Earth Sci* **57**: 189–203.
- Xue R-D, Ali A, and Barnard DR. 2008. Host species diversity and post-blood feeding carbohydrate availability enhance survival of females and fecundity in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Exp Parasitol* **119**: 225–8.
- Yadav KK, Datta S, Naglot A, *et al.* 2016. Diversity of Cultivable Midgut Microbiota at Different Stages of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India. *PLOS ONE* **11**: e0167409.
- Yamany AS and Abdel-Gaber R. 2024. Influence of adult body size on blood feeding behavior and eggs retention in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Microsc Res Tech* **87**: 2321–35.
- Yan J, Kim C-H, Chesser L, *et al.* 2023. Nutritional stress compromises mosquito fitness and antiviral immunity, while enhancing dengue virus infection susceptibility. *Commun Biol* **6**: 1123.
- Yang C and Iwasaki W. 2014. MetaMetaDB: A Database and Analytic System for Investigating Microbial Habitability. *PLOS ONE* **9**: e87126.

- Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, *et al.* 2006. Chikungunya Outbreaks Caused by African Genotype, India. *Emerg Infect Dis* **12**: 1580.
- Yin C, Sun P, Yu X, *et al.* 2020. Roles of Symbiotic Microorganisms in Arboviral Infection of Arthropod Vectors. *Trends Parasitol* **36**: 607–15.
- Yuan C, Xing L, Wang M, *et al.* 2021. Microbiota modulates gut immunity and promotes baculovirus infection in *Helicoverpa armigera*. *Insect Sci* **28**: 1766–79.
- Zhang L, Wang D, Shi P, *et al.* 2024. A naturally isolated symbiotic bacterium suppresses flavivirus transmission by *Aedes* mosquitoes. *Science* **384**: eadn9524.
- Zouache K, Martin E, Rahola N, *et al.* 2022. Larval habitat determines the bacterial and fungal microbiota of the mosquito vector *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol Ecol* **98**.

Annexes

I. Productions scientifiques

1) Articles scientifiques

- Mathilde Jaquet; Philippe Douchet; Eve Toulza; Thierry Lefèvre; Bruno Senghor; Jérôme Boissier; Olivier Lepais; Emilie Chancerel; Benjamin Gourbal; Olivier Rey. « Host genetic background more than the environment shapes the microbiota of the snail *Bulinus truncatus*, an intermediate host of *Schistosoma* species. » (doi: **10.22541/au.172924412.20944268/v1**), soumis à *Molecular Ecology* en Octobre 2024 (*chapitre 1*).
- Mathilde Jaquet; Davy Jiolle; Théo Mouillaud; Isabelle Conclois; Eve Toulza; Olivier Rey; Benjamin Gourbal; Christophe Paupy; Thierry Lefevre. « Natural plant sugars modulate *Aedes albopictus* survival, blood-feeding, and competence for dengue and chikungunya viruses », en cours d'écriture (*chapitre 2*).
- Mathilde Jaquet; Philippe Douchet; Antonio A. Vázquez; Annia Alba; Thomas Blanchon; Thomas Dagonet; Carole Leray; Marion Vittecoq; Thierry Lefevre; Sylvie Hurtrez-Boussès; Elodie Chapuis; Benjamin Gourbal; Olivier Rey. « The four seasons of microbiota: seasonal influence on *Galba truncatula* whole microbiota », en cours d'écriture (*annexe 1*).

2) Posters de conférences

- Mathilde Jaquet; Philippe Douchet; Benjamin Gourbal; Bruno Senghor; Jérôme Boissier; Thierry Lefèvre; Olivier Rey. « Schistosomiasis: Investigating the role of microbiome on snail competence », congrès ICOPA, Copenhague, Août 2022 & au Symposium de Parasitologie de Montpellier, Décembre 2023 (*annexe 2*) .
- Mathilde Jaquet; Philippe Douchet; Benjamin Gourbal; Bruno Senghor; Jérôme Boissier; Thierry Lefèvre; Olivier Rey. « Bilharziose : rôle du microbiote dans la compétence vectorielle », 11^{ème} congrès des doctorants de l'Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan, Novembre 2022 (*annexe 3*).
- Mathilde Jaquet; Benjamin Gourbal; Olivier Rey; Christophe Paupy; Thierry Lefevre. « MICROVECT : Evaluation de l'impact de la diète, du microbiote et des facteurs environnementaux sur la compétence vectorielle des vecteurs de maladies zoonotiques en Occitanie », école d'été pour les masters RIVOC, Université de Montpellier, Montpellier, Septembre 2023 (*annexe 4*).
- Mathilde Jaquet; Davy Jiolle; Isabelle Conclois; Olivier Rey; Benjamin Gourbal; Christophe Paupy; Thierry Lefèvre. « Unravelling the Impact of Plant-Based Diets on *Aedes albopictus*

Mosquitoes and Dengue Transmission », XXIIIrd European Society for Vector Ecology Conference (ESOVE) , Montpellier, Octobre 2024 (*annexe 5*).

3) Présentations orales

- Mathilde Jaquet. « What snails have in their gut and why does it matter? », Deuxième soirée du Microclub, Montpellier, Juin 2024.

4) Autres

- Animation d'une table ronde sur le thème du risque vectoriel en Occitanie au 11^{ème} congrès des doctorants de l'Association des Doctorants de l'Université de Perpignan Via Domitia (UPVDoc) (novembre 2022). Invités : Benjamin Gourbal et Antonio Alejandro Vazquez Perera.
- Présentation d'une photo intitulée « La vie secrète des moustiques enfin dévoilée » qui a remporté les prix du jury et du public au 11^{ème} congrès des doctorants de l'Université de Perpignan, Novembre 2022 (*annexe 6*).

5) Articles scientifiques hors travaux de thèse

- M. Jaquet, M. Bengue, K. Lambert, G. Carnac, D. Missé, C. Bisbal. « Human muscle cells sensitivity to chikungunya virus infection relies on their glycolysis activity and differentiation stage », publié dans Biochimie en Mars 2024, article issu des travaux de master 2 (*annexe 7*).
- Ruben Schols; Philippe Douchet; Maximilien Queron; Mathilde Jaquet; Antonio Vazquez; Tine Huyse; Ellen Decaestecker; Olivier Rey; Benjamin Gourbal; and Annia Alba. « **The microbiome of the globally invasive snail *Pseudosuccinea columella* does not drive liver fluke resistance** », en cours d'écriture, article en collaboration.
- Mathilde Jaquet. « **La bilharziose : perspectives thérapeutiques et préventives** », thèse d'exercice pour obtenir le titre de Docteur en Pharmacie, soutenue le 11 décembre 2023, obtenue avec la mention Très Bien.

II. Activités d'enseignement et d'encadrement

J'ai animé 18h de travaux pratiques à des étudiants en master 1 Biologie des Interactions, dans l'unité d'enseignement « Diagnostic environnemental et biodiversité », au sein de l'UFR des Sciences Exactes et Expérimentales au second semestre 2023 (mai 2023).

Encadrement d'un stagiaire de master 1 pour 3 mois.

III. Activités de médiation scientifique

Création, mise en place et animation d'un atelier grand public sur la bilharziose à la Fête de la Sciences (octobre 2022, octobre 2023).

Création du MICROCLUB, communauté qui rassemble les jeunes microbiologistes de Montpellier et ses alentours. Rédaction d'un bilan dans le but de demander des financements au Collège Doctoral LR.

IV. Engagement associatif

Dans l'UPVDoc, association des doctorants de l'Université Perpignan Via Domitia, poste de webmaster. Cette expérience m'a non seulement appris à gérer un site web mais également à organiser le congrès des doctorants. Ce dernier est un événement qui a lieu chaque année et qui regroupe une centaine de doctorants. Je me suis occupée d'un dossier de financement ainsi que d'une partie de l'organisation en termes de logistique.

Organisation des Doctoriales 2024 de MIVEGEC (avec d'autres doctorants : Elsa Beurrier, Noor Fattar, Silvère Giraud)

Annexe n°1

Publication en cours d'écriture :

The four seasons of microbiota: seasonal influence on *Galba truncatula* whole microbiota

Mathilde Jaquet ^{1,3} ; Philippe Douchet ¹ ; Benjamin Gourbal ¹ ; Antonio A. Vázquez ¹ ; Annia Alba ¹ ; Thomas Blanchon ² ; Thomas Dagonet ² ; Carole Leray ² ; Marion Vittecoq ² ; Sylvie Hurtrez-Boussès ³ ; Elodie Chapuis ³ ; Thierry Lefevre ³ ; Olivier Rey ¹

¹ IHPE, UMR5244, Université de Montpellier, CNRS, IFREMER, UPVD, 66000, Perpignan, France

² La Tour Du Valat, Research Institute for the Conservation of Mediterranean Wetlands, 13200, Arles, France

³ MIVEGEC, Université de Montpellier, IRD, CNRS, 34394, Montpellier, France

I. Materials and Methods

1. Field work

a) Field collection of samples in Camargue

The study was carried out in Southern France, at the Tour du Valat domain (TdV) located in the Regional Natural Park of Camargue (figure 1). The Camargue is a coastal wetland comprising a wide variety of aquatic systems in terms of hydrology, including lotic, lentic, permanent, temporary, saline and freshwater systems. We focused on a canal permanently filled with freshwater with a very low current flow (figure 1). Field sampling was conducted from March 2022 to May 2023 every month except December 2023. At each sampling point, we first filtered water along the water column from the surface to the water-sediment interface. We used filtration capsules of 0,45 µm mesh size (Waterra USA Inc.) connected to an electric water pump as previously described in Douchet and collaborators (Douchet *et al.* 2022). Filtration was performed until the filtration capsule was clogged and the final filtration volume was retrieved. Once the filtration completed, the filtration capsule was depleted from its water content, filled with 50 mL of Longmire solution (Kumar *et al.* 2020), vigorously shaken, and preserved at ambient temperature in the dark until used for environmental DNA (eDNA) extractions. At each temporal sampling point, a technical field negative control was obtained by filtering 1.5L of commercial spring water and following the same protocol for preservation.

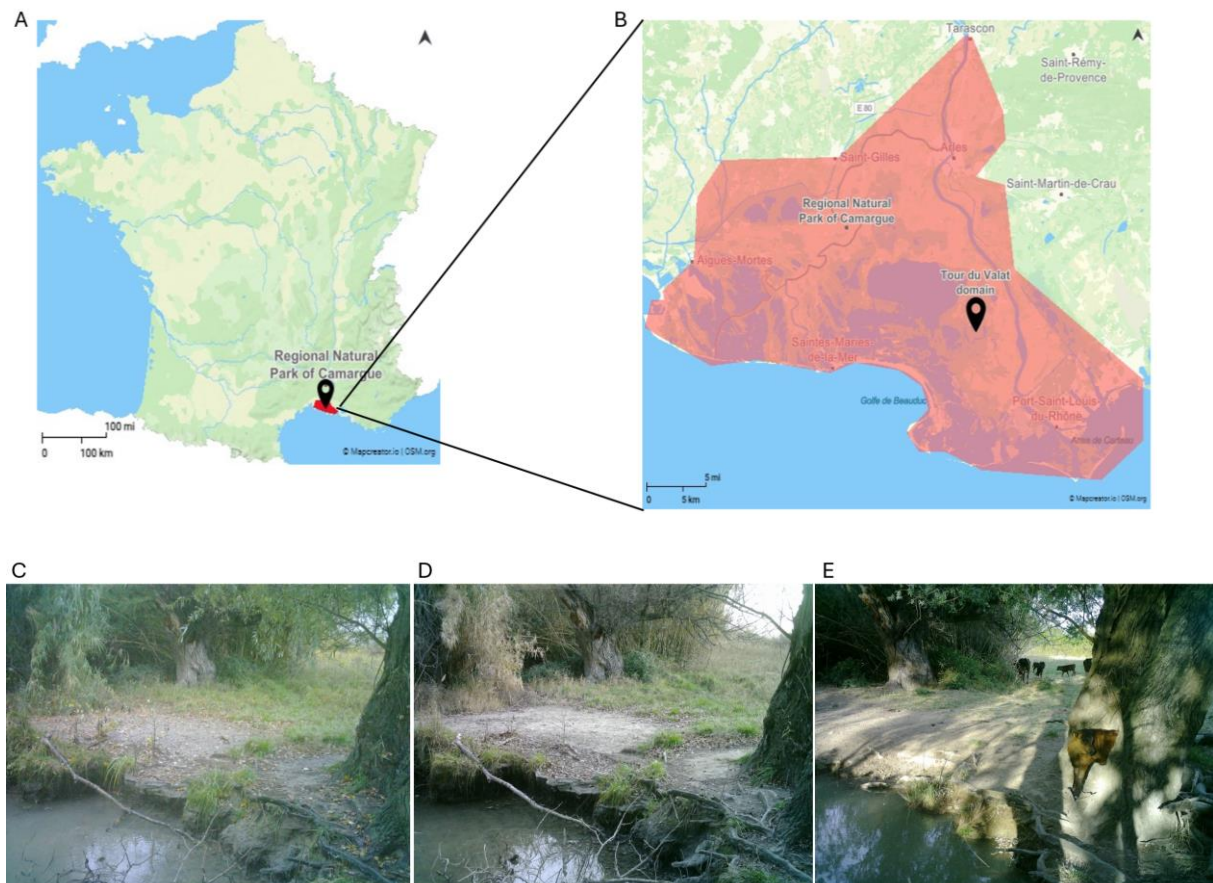


Figure 1. Localization map and pictures of the sampling site (A) At France's scale. (B) At Regional Natural Park of Camargue's scale. The red zone covers the Regional Natural Park of Camargue. The black pin shows the localization of the Tour du Valat domain. (C) Pictures of the sampling site in (C) January 2023, (D) February 2023 and (E) May 2023 showing a variable water level.

After completing the eDNA sampling, we conducted an active search for freshwater snails along the canal banks, using a standardized 15-minute sampling effort, by the same observer all along the study, and always during the morning (9h to 12h). Snails were mostly collected above the water line, consistent with their amphibious habits. The 15-minutes sampling effort generally led to the prospect of a transect five to ten meters long along the banks, and hence maximizing the probability of sampling snails from a single sub-populations. All snails collected during the sampling period were placed immediately into a 15 ml universal tube containing 1mL of water and kept cool prior to returning to the laboratory within the next 8 hours post-sampling.

After taxonomic identification (following the keys of (Glöer 2019)), *G. truncatula* snails were individualized in well plates filled with dechlorinated water and left for cercarial shedding under a 12h:12h sequential light:dark photoperiod. At the end of this shedding period, up to 16 non-

emitting *G. truncatula* snail individuals were extracted from their shell, after a quick heating step at 70°C for 1 minute, with decontaminated clams, and individualized into a sterile 1.5ml tube containing 70% ethanol. Clams were decontaminated between each sample using a DNA AWAY solution. The extraction of snail bodies from their shells was achieved to avoid DNA contamination from microorganisms, including bacteria, established on snail shells. Overall, 131 adult *G. truncatula* snails were prepared as above (mean = 10 ; min = 3; max = 16; Suppl. table 1) .

b) *In situ* measurements of environmental factors

The oxygen/temperature (PODOA/PODOB), turbidity/temperature (PNEPA/PNEPB), conductivity/temperature (PC4EA/PC4EB), and pH/redox/temperature (PPHRA/PPHRB) sensors from Ponsel Odeon probe (Aqualabo, Marne, France) were used to measure pH, redox potential, conductivity, dissolved oxygen concentration (mg/L), salinity, turbidity and water temperature, using the proper electrodes.

A BenthosTorch (bbe Moldaenke, Germany) was used to quantify benthic algae biomass monthly. The BenthosTorch is a deployable pulse-amplitude-modulated spectrofluorimetric tool that uses predefined algorithms to instantly identify the chlorophyll-a fluorescence signal of benthic algae and primary producers, including diatoms, cyanobacteria, and green algae (Carpentier *et al.* 2013). It emits light pulses at 470, 525, 610, and 700 nm and records the chlorophyll-a response at 690 nm (Kahlert and McKie 2014). We placed the BenthosTorch on the substrate, ensuring no light entered the algal surface area of excitation (Kaylor *et al.* 2018). The sampled area, where the beam of light excited chlorophyll-a, measured 1 cm², with care taken to avoid physically disturbing the biofilm. Ten seconds of exposure provided chlorophyll-a concentrations in diatoms, cyanobacteria, and green algae, with the fluorescence algorithm calculating the proportion of each group (Catherine *et al.* 2012). To reduce variation, we performed three readings for each measurement and averaged them as recommended by the manufacturer.

Those environmental parameters have been measured for six months over the sampling period from October 2022 to May 2023.

2. DNA Extraction from environmental matrices and snail hosts

All pre-PCR steps including DNA extraction and the preparation of PCR mixes were conducted under a sterile hood decontaminated before and after each usage with 10% bleach, 70% ethanol, a DNA AWAY solution followed by a UV light exposure for 20 minutes.

Total eDNAs from water filtrations were extracted following (Douchet *et al.* 2022). Briefly, the Longmire buffer contained within each filtration capsule was equally split into three 50 mL tubes. For the field negative controls (i.e. Spring water filtrates), each capsule content was recovered in one 50 ml tube only. The tubes were centrifuged for 20 min at 16,000 x g and the supernatant was discarded. We then collected up to 1g of sediment from the pellet from each tube or 500 µl of Longmire remaining at the base of the tube when not enough material was observed. Thus, total eDNAs from each capsule were extracted in triplicate. No pellets were observed for filtration negative controls (consisting in spring water) after centrifugation. For these samples, 500 µL of Longmire were retained and resuspended after removing the supernatant and were processed as the other samples. This step led to the processing of 46 samples (i.e. 2 extraction replicates for each of the twelve eDNA samples and one field negative control per month except for March-22). The total eDNA of these 46 samples was extracted using the DNeasy PowerSoil Pro kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol performing the physical lysis with a MagNA Lyser at a speed of 7000 × g for 30 s.

Total genomic DNA from each of the 131 snails removed from their shell was extracted using DNeasy 96 Blood and Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's protocol. Two negative control extractions consisting of empty 1.5 ml tubes same as those used for snail preservation were added in the process.

3. Sequencing of bacterial communities and metabarcoding analyses

A total of 179 bacterial 16S metabarcoding libraries were prepared following the *Illumina* two-step PCR protocol; including the DNA extracts of the 131 snails, 46 eDNA replicates consisting in 24 eDNA samples (each field environmental sample was extracted in duplicate) and 22 technical field negative controls (each control was extracted in duplicate), and 2 negative PCR controls (millip water). We targeted the variable V3-V4 loops region of the 16S rDNA gene using the 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') primers (Klindworth *et al.* 2013) combined with universal *Illumina* adapters.

First PCRs were performed using the Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England BioLabs), in a 25µL final volume containing 2 µL of template DNA and using a PCR program consisting in an initial denaturation step of 30s at 98°C followed by 32 cycles containing a denaturation step of 6 sec at 98°C, an annealing step of 30 sec at 55°C, and an elongation step of 8 sec at 72°C and ending with a final elongation step of 60 sec at 65°C. We used 5 µL of the PCR products to check the PCR

products quality and integrity through electrophoresis on agarose gels. The 20µL left were sent to the BioEnvironnement platform (Université Perpignan Via Domitia) for the second PCR amplification step, the preparations of libraries and sequencing. Libraries were performed using Illumina Nextera index kit and Q5 high fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Indexed PCR products were then normalized with SequalPrep plates (ThermoFisher) and paired-end sequenced on a MiSeq instrument using v2 chemistry (2 x 250 bp).

Raw data were processed under R (v 4.2.3 2023-03-15) using a pipeline based on the '*dada2*' package (v. 1.28.0) (Callahan *et al.* 2016) on the Roscoff Bioinformatics platform ABiMS cloud. Briefly, this pipeline consists in removing primers from the obtained sequenced reads (max.mismatch = 1), trimming and quality filtering reads (minLen = 150, maxN = 0, maxEE = c(3, 3), truncQ = 2), denoising, dereplicating, merging paired-end reads (maxMismatch = 0), building the Amplicon Sequence Variant (ASV) table and removing potential chimeric sequences produced during the process (method = 'consensus'). The taxonomic assignment (multithread = TRUE, minBoot = 60) of the resulting filtered and cleaned ASVs was performed using the Ribosomal Database Project (RDP) classifier (Wang *et al.* 2007) and based on the Silva_train_set and silva_species_assignment 138.1 datasets (Quast *et al.* 2012). Eukaryotic, mitochondrial, and chloroplast sequences were removed, as well as ASVs not affiliated to 'Bacteria' at the Kingdom taxonomic levels. The obtained ASV sequence table was finally merged with the taxonomy database and the sample metadata matrix for subsequent analyses using the '*phyloseq*' R package (v. 1.44.0) (McMurdie and Holmes 2013).

The final ASV dataset was next cleaned from possible contamination during field collection and biomolecular processing (DNA extraction, PCR). To this aim, ASVs obtained from negative PCR controls were removed from all samples through the 'prune_taxa' function of the '*phyloseq*' package. Then, the 'merge_phyloseq' function of the '*phyloseq*' package was used to generate the whole object containing all the samples. Moreover, ASV present at low abundance (< 0.005%; (Bokulich *et al.* 2013)) were filtered to account for possible sequencing errors. Briefly, the whole phyloseq object was transformed in relative abundance with the 'transform_sample_count' function of the '*phyloseq*' package. Then, the low abundant taxa were removed through the 'prune_taxa' function of the '*phyloseq*' package.

To assess whether sequencing depth was satisfactory across samples, rarefaction curves were generated using 'rarecurve' function from the '*vegan*' R package (v. 2.6.4) (Oksanen *et al.* 2022). The abundance of each ASV in each snail host was normalized through a rarefaction procedure based on the poorest sample in terms of ASV counts (i.e. 4500, see suppl. Table 2). Rarefaction was achieved by random sub-sampling using the 'rarefy_even_depth' function of the '*phyloseq*'

package (rngseed = 1000) and was applied at the 4500 thresholds (McMurdie and Holmes 2013). Reads counts per sample during the preprocessing step are provided in suppl. Table 2.

4. Infection status and genotyping of *G. truncatula* snails

a) Trematode infection status of *G. truncatula* snails

The presence of developing trematodes within each of the 131 snails was diagnosed using the Trem_16S_F1 (GACGGAAAGACCCCRAGA) and Trem-16S_R2 (CRCCGGTYTTAACTCARYTCAT) 16S trematode metabarcode developed by (Douchet *et al.* 2022). DNA extracts from each snail was first diluted to 1/100th to limit the potential effect of PCR inhibitors and hence limit PCR false negatives. PCRs were performed using the GoTaq® G2 Hot Start Polymerase kit (Promega). Each PCR reaction contained Green Buffer at 1X, MgCl₂ at 1.5mM, dNTPs at 0.2μM, forward and reverse primers at 0.4μM, 1.25 units of GoTaq G2 Hot Start, 2μL of 1/100 DNA (~ 0.2 ng) sample and ultrapure water in a final reaction volume of 10μL. The PCR program was as follows: an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, hybridization at 54°C for 30 sec and elongation at 72°C for 15 sec, and a final elongation step at 72°C for 5 min. A subset of 5μL of the resulting PCR products were migrated on a 2% agarose gel for 30 min at 110V and revealed under UV. Positive samples were reamplified using the same Trem_16S_F1 and Trem_16S_R2 primers combined with Illumina sequencing adapters and clear Buffer. The resulting amplicons were sent to the Bio-Environnement platform (University of Perpignan Via Domitia) to identify the trematodes potentially developing within snail hosts. Libraries were performed using Illumina Nextera index kit and Q5 high fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Indexed PCR products were then normalized with SequalPrep plates (ThermoFisher) and paired-end sequenced on a MiSeq instrument using v2 chemistry (2 x 250 bp).

b) Microsporidia infection status of *G. truncatula* snails

The presence of microsporidia within a subset of the 10 snails (chosen between different seasons, trematode infected or not) was diagnosed using the V1F (CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC) and 530sR (CCGCGGCKGCTGGCAC) V1-V3 region of the Microsporidia small subunit rDNA metabarcode (Baker *et al.* 1995; Weiss *et al.* 2013; Dubuffet *et al.* 2021). PCRs were performed using the GoTaq® G2 Hot Start Polymerase kit (Promega). Each PCR reaction contained Clear Buffer at 1X, MgCl₂ at 1.5mM, dNTPs at 0.2μM, forward and reverse primers at 0.4μM, 1.25 units of GoTaq G2 Hot Start, 2μL of DNA (~ 0.2 ng) sample and ultrapure water in a final reaction volume

of 30µL. The PCR program was as follows: an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, hybridization at 64°C for 30 sec and elongation at 72°C for 30 sec, and a final elongation step at 72°C for 5 min. A subset of 5µL of the resulting PCR products were migrated on a 2% agarose gel for 20 min at 100V and revealed under UV. The resulting amplicons were sent to the Bio-Environnement platform (University of Perpignan Via Domitia) to identify the microsporidia potentially developing within snail hosts. Libraries were performed using Illumina Nextera index kit and Q5 high fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Indexed PCR products were then normalized with SequalPrep plates (ThermoFisher) and paired-end sequenced on a MiSeq instrument using v2 chemistry (2 x 250 bp).

4. Microsatellite genotyping

To check whether all the snails collected on the studied site belonged to the same population, we genotyped each snail at 6 microsatellite markers (Trouvé *et al.* 2000). PCRs were achieved using 1µl of individual DNA extracts diluted to 1/20 as template. Each microsatellite locus were amplified from 1µL of diluted DNA for all loci in a 9µL reaction volume containing 2µL of buffer 10X (Promega), 3mM Mg²⁺ (Promega), 2mM dNTPs (Thermo Scientific), 0,2mM of each primer and 1,25u of G2 Flexi Taq DNA polymerase (Promega).

Thermocycling, performed using a Mastercycler X50a PCR Thermocycler 96-well (Eppendorf), consisted of an initial denaturation at 94 °C for 3 min, 30 cycles at 94 °C for 1 min, annealing temperature at 52°C for 30 s, 72 °C for 45 s and a final elongation step at 72 °C for 10 min. Primers were fluorescently labelled to be used in an ABI automated sequencer (ABI-Prism 3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Perkin-Elmer).

One microliter of polymerase chain reaction (PCR) products amplified from each DNA sample was pooled in two groups of loci (Lt24, Lt36, Lt37 group and Lt9, Lt16, Lt21 group), together with 0.15 µL of internal size standards (GENESCAN 500 LIZ, Applera), and diluted in Hi-Di Formamide (15 µL) for automatic electrophoresis. Measurements of allele length were automated with GeneMapper® software (Applied Biosystems). Each *G. truncatula* snail was genotyped at the six studied loci.

We estimated current parameters of population genetics such as mean number of alleles (Ar), observed (HO) and expected (HE) heterozygosities, departure from Hardy–Weinberg equilibrium (FIS) and pairwise differentiation between populations (FST). We considered all individuals sampled within the same month as belonging to the same *G. truncatula* population, and those

sampled in different months as belonging to different populations. Estimations were computed using Rstudio (v. 4.3.0 2023-04-21 ucrt) software.

5. Statistical analyses

a) Diversity in environmental and snail-associated bacterial communities

The diversity alpha of bacterial communities associated with environmental matrices and *G. truncatula* snails was assessed at the month level based on the absolute number of ASVs, the Shannon and Simpson's diversity indices as implemented in the '*microbiome*' R package (v. 1.22.0) (Lahti and Shetty 2012). Kruskal-Wallis nonparametric tests were computed to compare each of these alpha-diversity indices between sample type (i.e. snails *versus* eDNA samples) and between months using the '*stats*' R package (v. 4.3.0) (R Core Team 2023). Those tests were followed by pairwise multiple comparisons using the '*FSA::dunnTest*' of the '*FSA*' R package (v. 0.9.5) and adjusting p-values based on the Benjamini-Hochberg method (Dunn 1964).

b) Temporal dynamic of bacterial communities associated with *G. truncatula* snails and environmental samples

To investigate for possible structuration of bacterial communities of environmental samples and *G. truncatula* snails depending on the seasons/months we first conducted a Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the '*pco*' function of the '*ecodist*' package (v. 2.1.3) (Goslee and Urban 2007). We next computed pairwise Jaccard and Bray-Curtis indices between each pair of samples based on their bacterial community using the '*distance*' function of the '*phyloseq*' R package. Based on these beta-diversity indices, we ran a series of permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA) to specifically test for: 1- Differences in aquatic bacterial communities (i.e. environmental samples) and those associated with snails. Here, we accounted for the sampling time point (i.e. month) as an additional explanatory variable and for a possible interaction between month and the nature of the sample (environment *versus* snail). 2- Monthly/Seasonal differences in aquatic bacterial communities and those associated with snails. 3 - An effect of trematode infection status (all trematode species combined) on the difference in *G. truncatula* microbiota. Here we accounted for the sampling site as an additional explanatory variable and an interaction term between the sampling site and the trematodes infection status. 4 - An effect of microsporidia infection status (all microsporidia species combined) on the difference in *G. truncatula* microbiota. Here we accounted for the sampling site as an additional explanatory variable and an interaction term between the sampling site and the microsporidia infection status.

PERMANOVA were conducted using the 'adonis2' function implemented in the 'vegan' R package (Oksanen *et al.* 2022), and setting the number of permutations to 10 000.

c) Identification of factors structuring environmental and snail bacterial communities

To specifically assess the relative effect of the environmental bacterial communities and the genetic background of snails on whole-body snail microbiota dynamic, we tested for correlation between three pairwise matrices including, the Jaccard indices computed between environmental bacterial communities at each sampling step (months), the Jaccard indices computed between bacterial communities associated with *G. truncatula* individuals and the Nei's genetic distance between snail hosts. In order to have similar/comparable dimensions for the three matrices, 54 samples from the original matrices were discarded using the 'subset_samples' function from the 'phyloseq' R package. This step led to two matrices of 76*76 dimensions. Based on those matrices, we pseudoreplicated the Jaccard indices computed between environmental bacterial communities at each sampling step/month matrices to transform it in the same dimensions.

d) Identification of environmental factors structuring environmental and snail bacterial communities

Only the months with recorded environmental parameters were included in the analysis, resulting in data for six months: October-22, November-22, January-23, February-23, March-23, May-23 and that analysis was conducted on the *G. truncatula* snails samples. 48 samples were discarded from the original *G. truncatula* phyloseq object using the 'subset_samples' function from the 'phyloseq' R package. Canonical correspondence analysis (CCA) reflects the relationship between the microbiota and the environmental factors. This analysis was performed using the 'cca' function from 'vegan' R package to determine the major environmental factors influencing the observed microbiota dynamic/distribution.

II. Results

1. Diversity in environmental and *G. truncatula* associated bacterial communities

Based on the microbial communities characterized from the 22 environmental samples and the 130 *G. truncatula* individuals, we found that the composition of the microbiota of *G. truncatula* at the whole-body scale differs from that of bacterial communities present in the surrounding

aquatic environment. The first two axes of the Principal Coordinates Analysis (PCoA) performed on the Jaccard distance matrix obtained among all samples (i.e. *G. truncatula* snails and environmental samples) and all months explained 14.86% of the total variance (Fig. 2). Samples of *G. truncatula* and environmental samples cluster into two non-overlapping groups along the first axis. Such difference in the composition of bacterial communities between the environmental samples and *G. truncatula* is statistically confirmed by the PERMANOVA analysis which indicates that the type of sample (i.e. *G. truncatula* snails and environmental samples) (F-value = 14.2 ; Pval < 0.0001) and of the month (F-value = 4.3 ; Pval < 0.0001) explain part of the total variance observed in the overall dataset. Similar results were obtained from the PERMANOVA analysis based on the Bray-Curtis distances (nature of the sample: F-value = 19.8 ; Pval < 0.0001; month: F-value = 6.2 ; Pval < 0.0001; Suppl. Fig. 1).

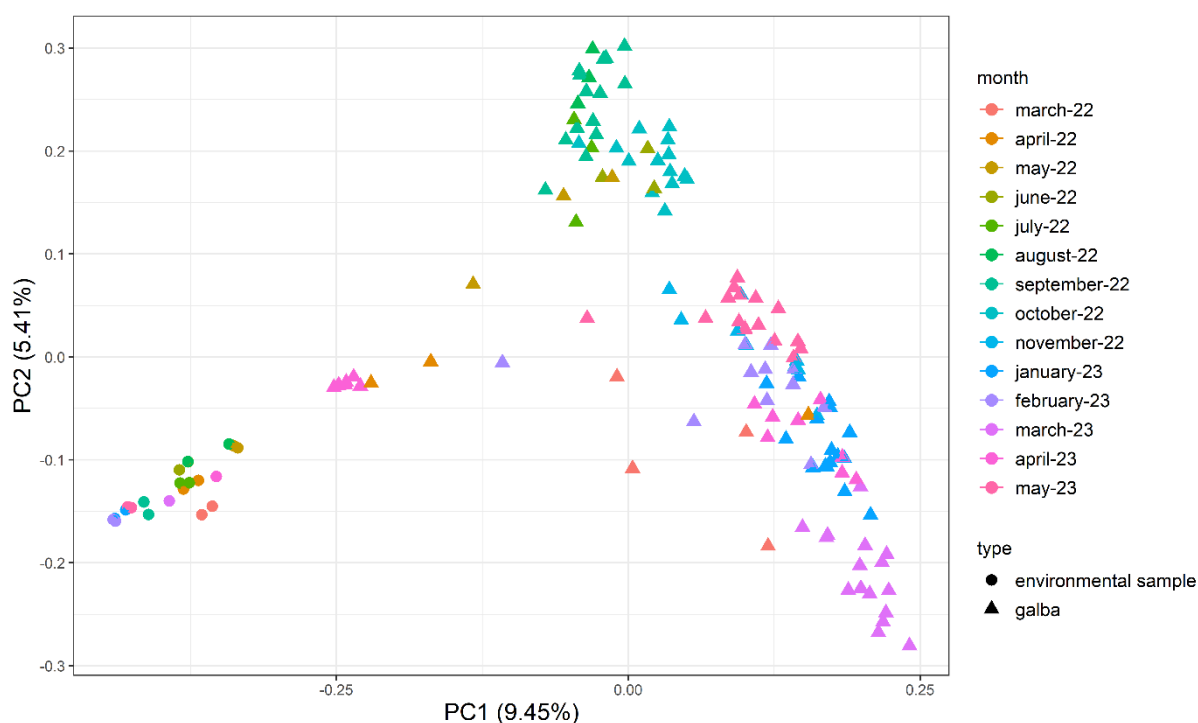


Figure 2. Principal coordinate analysis (PCoA) plot showing environmental samples (dots) and *G. truncatula* snail associated (triangles) bacterial communities distributed along the two first PCoA axes computed based on pairwise Jaccard distances obtained between each pair of samples.

2. Structure of *G. truncatula* and environmental bacterial communities along months

When examining the dynamics of *G. truncatula* microbiota over the different months, the PERMANOVA analysis revealed significant differences in the bacterial communities associated with *G. truncatula* (F-value = 3.3; P-val < 0.0001) (figure 3). The major genus varied along the different months with for example, *Pseudomonas* being predominant in March and June 2022,

while *Aeromonas* was predominant in April and May 2022 and May 2023 (Fig. 3A). Those results were visually confirmed by the analysis of the monthly microbiota trajectories showing the displacement of the communities along time (Fig. 3B).

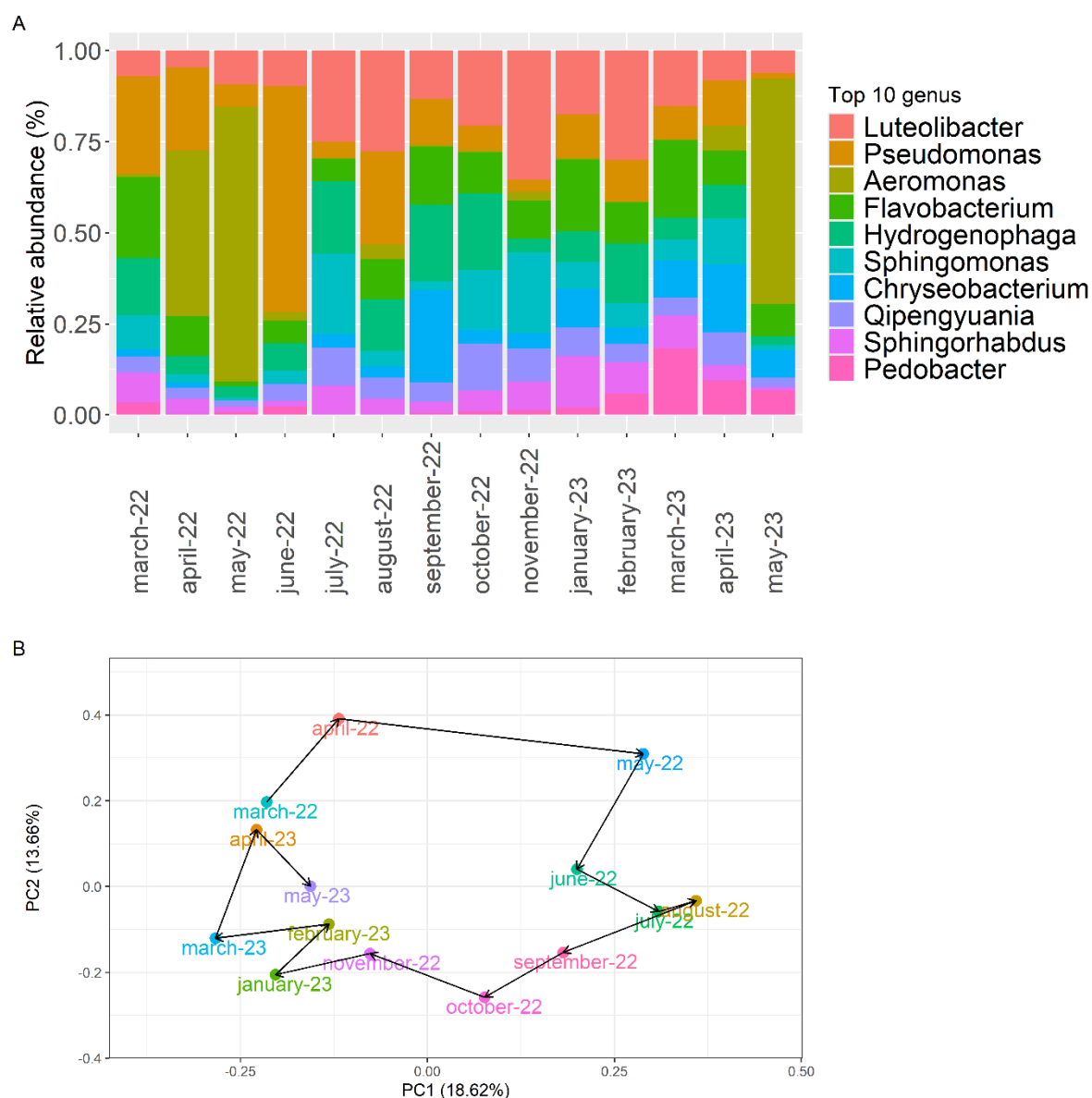


Figure 3. (A) Barplot showing the relative abundance of the ten most abundant genera in the microbiota of *G. truncatula* over 14 months, from March 2022 to May 2023. (B) Plot showing the mean trajectory of the microbiota of *G. truncatula* over the months in a PCA two-dimensional space composed of the two first axes that together explain 32,28% of the total variance.

2.2.

To dig into the factors that play a role in the temporal dynamics of *G. truncatula*, an MRM analysis was conducted. Based on that analysis, the variables that explain the monthly dynamic of *G. truncatula* microbiota (based on the mean Jaccard indices calculated between *G. truncatula* microbiota at the population level) are, in order of importance, the mean Jaccard indices calculated between the aquatic bacterial communities at the population/month level ($r = 0.27$; $P_{val} = 0.03$), followed by the Nei's genetic distance between populations ($r = -0.006$; $P_{val} = 0.98$).

Then, to see if the aquatic environmental communities followed the same pattern of trajectories, we conducted a principal coordinate analysis for both datasets: on the mean Jaccard indices calculated between *G. truncatula* microbiota at the individual level (Fig. 4A) and on the mean Jaccard indices calculated between the aquatic bacterial communities at the population/month level (Fig. 4B).

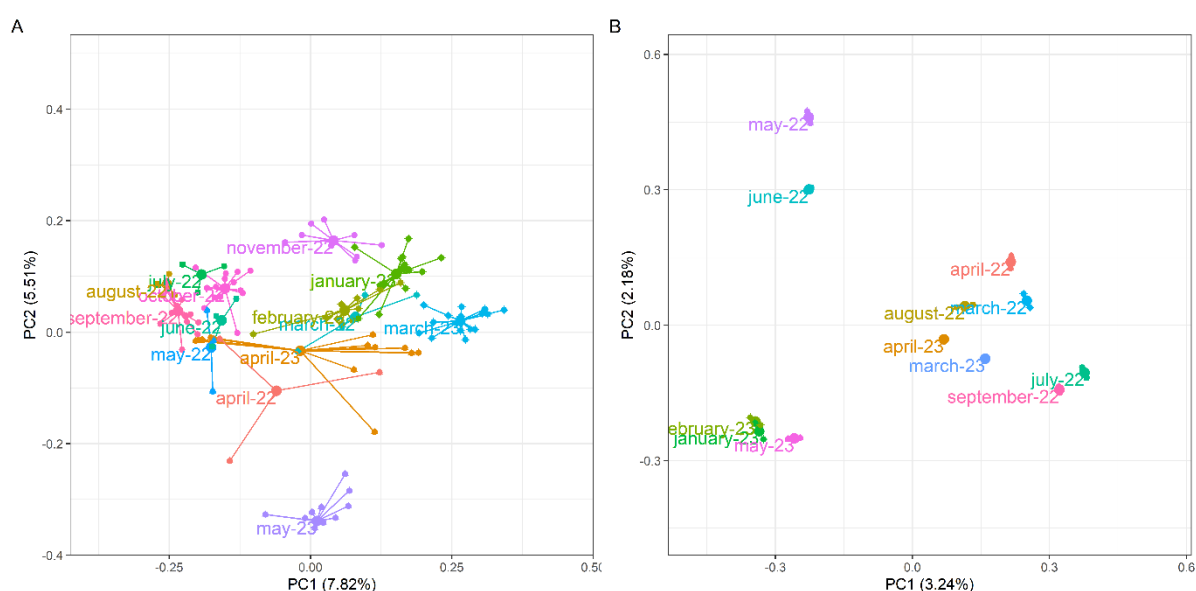


Figure 4. Principal coordinate analysis plot showing (A) *G. truncatula* and (B) environmental samples associated bacterial communities distributed along the first PCoA axes, computed on pairwise Jaccard distances obtained between each monthly population.

3. Identification of structuring factors

A CCA based on the snails ASV table was performed to assess the effect of environmental abiotic and biotic factors/variables (Fig. 5). The correlation of environmental factors with CCA1, CCA2 was 31.73% and 26.25%, respectively. The results of CCA analysis indicated that the samples collected in winter were concentrated in the second quadrant, while those in the spring were concentrated in the first quadrant. In winter, water pH showed a positive correlation with the bacterial communities of snails, while aquatic temperature exhibited a negative correlation. In

spring, aquatic oxygen concentration were positively correlated with the bacterial communities of snails.

Temp, AP and TP contents ($p < 0.01$) were significantly correlated with the abundance of soil microorganisms in the summer subsidence area, while DMC and TOC contents ($p < 0.01$) were significantly correlated with the abundance of soil microorganisms in the winter subsidence area.

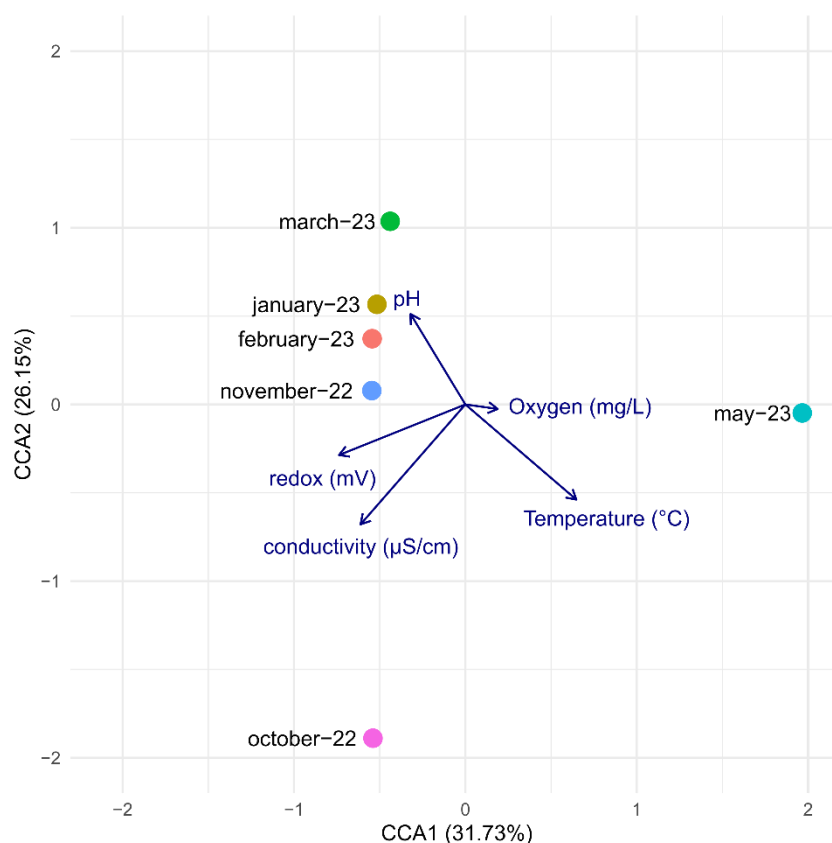


Figure 5. Canonical Correspondence Analysis (link beta diversity/abiotic factors)

Annexe n°2

Présentation de poster: International congress of parasitology (ICOPA 2021) & au Symposium de Parasitologie de Montpellier (2023)

Schistosomiasis: Linking diet, microbiome and snail competence

Mathilde Jaquet*; Philippe Douchet*; Benjamin Gourbal; Bruno Senghor; Jérôme Boissier; Thierry Lefevre; Olivier Rey.

Background and aims: Accruing evidence indicate that microbiomes mediate host-pathogen interactions. Moreover, food resources greatly influence organisms' microbiomes. Thus, variations in diet are expected to have significant impact on individual microbiota composition and, in turn, on the competence of vectors/hosts (their propensity to amplify pathogens at levels that are transmitted to other hosts). We tested this hypothesis on *Bulinus truncatus* snails that host *Schistosoma haematobium* the trematode responsible for urogenital schistosomiasis, a tropical neglected infectious disease. The purpose of this work is to characterize the diversity of diet and that of microbiomes in natural populations of *Bulinus truncatus* and to study their potential influence on the competence of *B. truncatus* toward *Schistosoma haematobium*

Methods: We first conducted a malacological study at nine ecologically contrasted *S. haematobium* transmission sites in Senegal. The diet and the microbiomes' community were characterized on a total of 136 *B. truncatus* from the nine sampling sites using a metabarcoding approach. We also conducted an experimental infection of wild *B. truncatus* from four sites to quantify their competence at the population level.

Results: A total of 800 *B. truncatus* were sampled over the nine targeted sites. Natural prevalence of *S. haematobium* was low (2/800). The diet and microbiome communities are currently analysed. The result of the experimental infection is due at the end of March.

Conclusion: Together these results will document for the first time the diversity of microbiomes' communities and diet of *B. truncatus* from the field and their potential link with their competence.

Schistosomiasis: Investigating the role of microbiome on snail competence

Mathilde Jaquet¹; Philippe Douchet¹; Benjamin Gourbal¹; Bruno Senghor²; Jérôme Boissier¹; Thierry Lefevre³; Olivier Rey¹.

¹ Univ. Montpellier, CNRS, IFREMER, UPVD, IHPE, F-66000 Perpignan, France

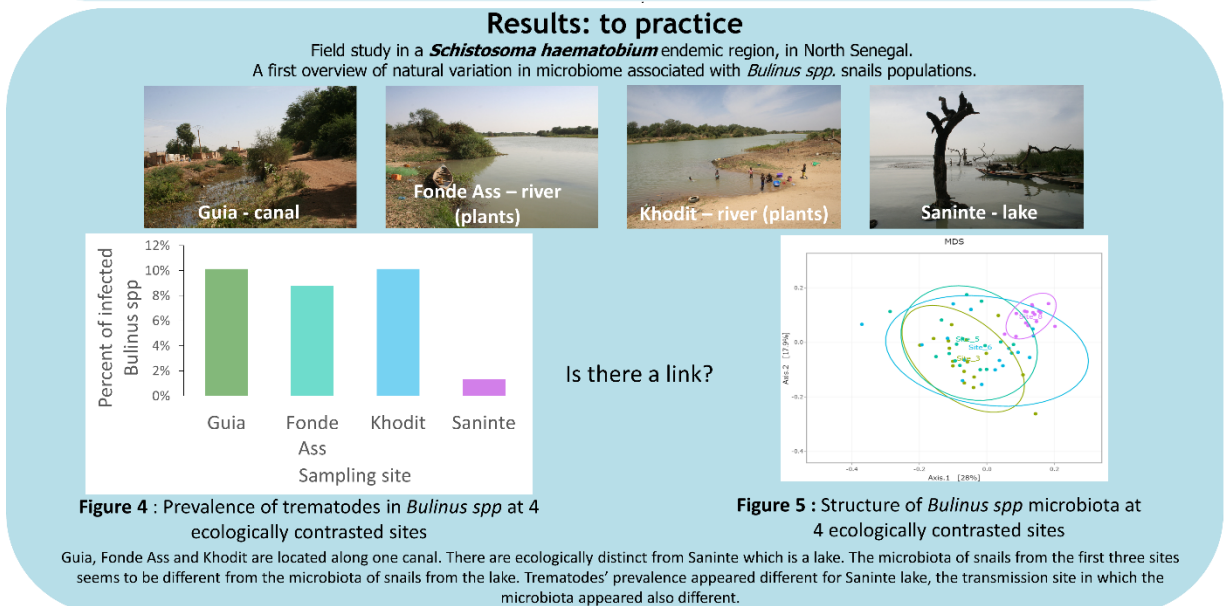
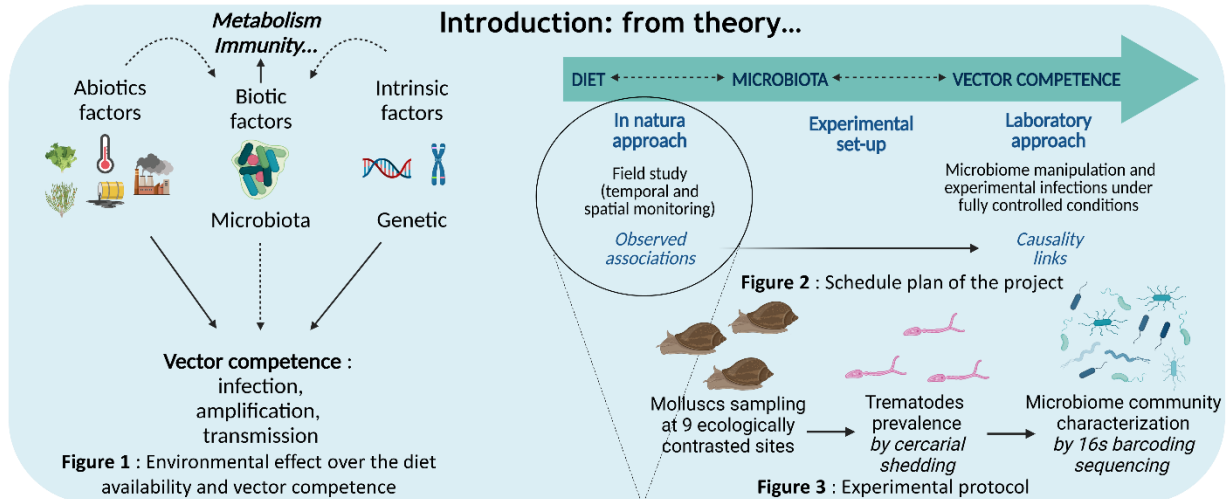
² VITROME, Campus International IRD-UCAD de l'IRD, 1386 Dakar, Senegal

³ MIVEGEC, IRD, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France.

One world – One health – One ocean



Contacts: mathilde.jaquet@univ-perp.fr
olivier.rey@univ-perp.fr



Conclusion

The prevalence of trematodes infecting *Bulinus spp.* from 4 ecologically contrasted sites in Senegal seems to be linked to the microbiota of the prevailing snails. Nonetheless, this link was not observed for all 9 sites. Hence, further experiments are needed to confirm it.

Perspectives

- Analyses on the microbiota composition
- Bulinus spp.* species characterisation
- Diet characterisation

References: S. Gervasi et al., *Trends in Parasitology* 31, 419 (2015); S. R. Kennedy et al., *Mol Ecol* 29, 1001 (2020); N. A. Broderick et al., *mBio* 5, e01117 (2014); N. Buchon et al., *Genes Dev* 23, 2333 (2009)

Acknowledgements: this work is supported by grant by



Annexe n°3

Présentation de poster : Congrès des doctorants de l'Université de Perpignan Via Domitia 2021

Présentation d'une photographie : Congrès des doctorants de l'Université de Perpignan Via Domitia 2021 (Prix du jury & Prix du public)

Bilharziose : rôle du microbiote dans la compétence vectorielle

Mathilde Jaquet¹; Philippe Douchet¹; Benjamin Gourbal¹; Bruno Senghor²; Jérôme Boissier¹; Thierry Lefevre³; Olivier Rey¹.

¹ Université de Montpellier, CNRS, IFREMER, UPVD, IHPE, F-66000 Perpignan, France

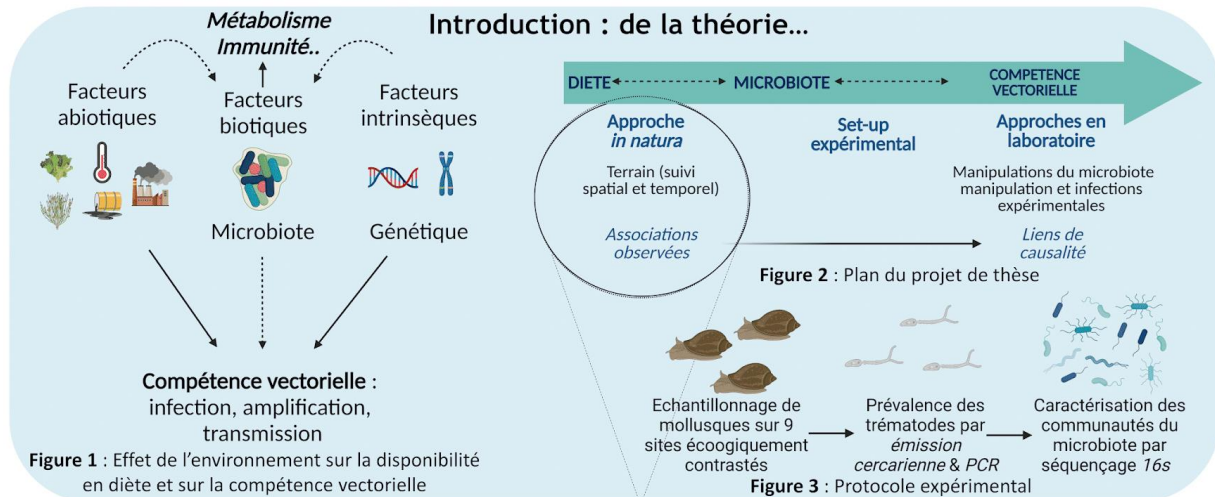
² VITROME, Campus International IRD-UCAD de l'IRD, 1386 Dakar, Senegal

³ MIVEGEC, IRD, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France.

One world – One health – One ocean



Contacts: mathilde.jaquet@univ-perp.fr
olivier.rey@univ-perp.fr



Résultats : à la pratique...

Etude de terrain dans une région endémique à *Schistosoma haematobium*, au Nord du Sénégal. Premier aperçu de la variation naturelle du microbiome associé aux populations d'escargots *Bulinus* spp.



Figure 4 : Prévalence des trématodes infectant *Bulinus* spp aux 4 sites écologiquement contrastés

Guia, Fonde Ass et Khodit sont situés le long d'un même canal. Ils sont écologiquement distincts de Saninte qui est un lac. Le microbiote des mollusques provenant des trois premiers sites semble différent du microbiote des mollusques provenant du lac. De même, la prévalence des trématodes apparaît comme différente pour le lac, site de transmission où le microbiote est différent.

Figure 5 : Structure du microbiote des *Bulinus* spp microbiota aux 4 sites écologiquement contrastés

Conclusion

La prévalence de trématodes infectants *Bulinus* spp aux 4 sites écologiquement contrastés au Sénégal semble liée au microbiote des mollusques. Néanmoins, ce lien n'est pas observé pour les 9 sites prospectés. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires afin de confirmer ce lien.

Perspectives

- Analyses de la composition du microbiote
- Caractérisation des espèces de *Bulinus* spp.
- Caractérisation de la diète

Références: S. Gervasi et al., *Trends in Parasitology* **31**, 419 (2015); S. R. Kennedy et al., *Mol Ecol* **29**, 1001 (2020); N. A. Broderick et al., *mBio* **5**, e01117 (2014); N. Buchon et al., *Genes Dev* **23**, 2333 (2009)

Ce travail a été supporté par des financements de



Image n° 3

POUR MIEUX COMPRENDRE...

Cette image représente un couple de moustiques tigres gorgés de nectar de romarin : on le voit à leur abdomen qui est distendu.

En effet, les moustiques sont bien plus que des suceurs de sang qui nous pourrissent l'existence ! Tout un pan de leur vie n'a rien à voir avec les piqûres et ils détiennent un véritable rôle dans l'écosystème : leur nourriture de base est le sucre végétal. En cherchant ces nectars floraux, ils pollinisent les fleurs qu'ils visitent !

Par conséquent, l'élimination de masse des moustiques pourrait avoir des répercussions dans beaucoup de domaines y compris la pollinisation. Dans un monde où les écosystèmes s'effondrent et où les populations de pollinisateurs déclinent, nous avons besoin de toute l'aide possible...

MOTS-CLÉS

Aedes albopictus, biologie, écologie, pollinisateurs, plantes



La vie secrète des moustiques enfin dévoilée

Mathilde JAQUET

Biologie - IHPE/MiVEGEC - mathilde.jaquet@univ-perp.fr



Annexe n°4

Présentation de poster : Ecole d'été RIVOC pour les étudiants en master & Congrès des doctorants de l'Université de Perpignan 2023 (Prix du public)

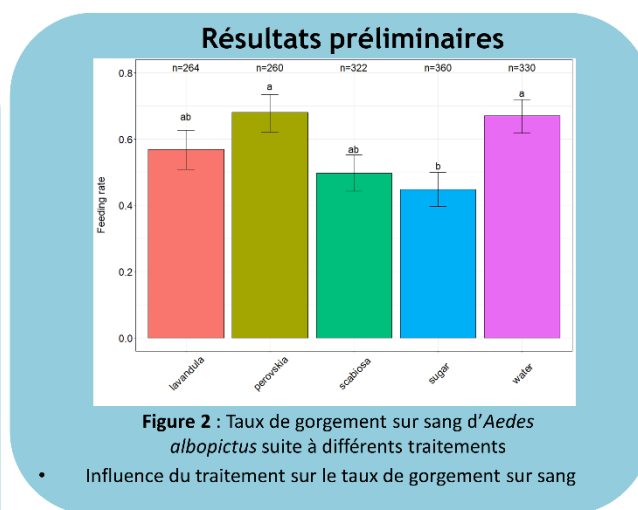
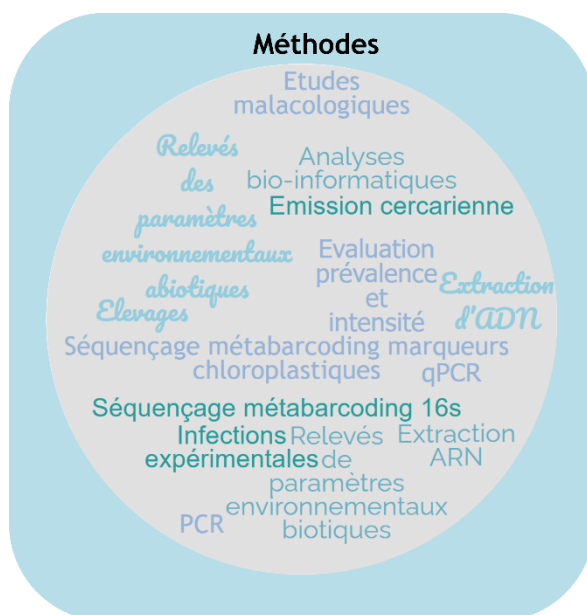
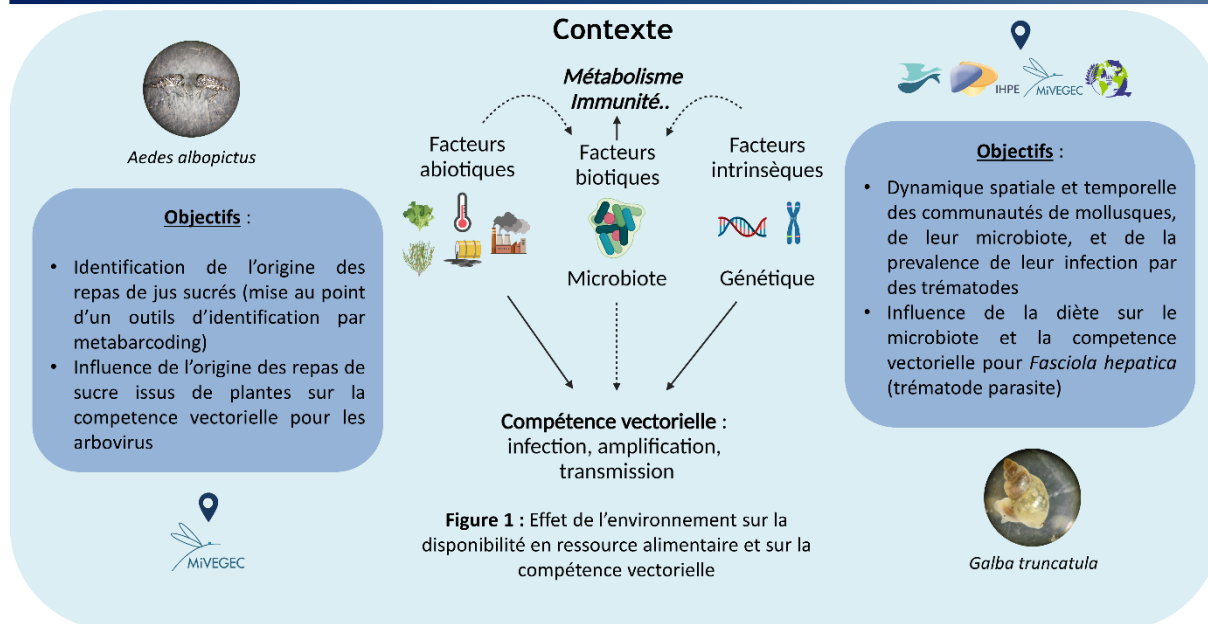
Présentation orale : projet RIVOC Microvect lors de l'Assemblée Générale RIVOC

MICROVECT : Evaluation de l'impact de la diète, du microbiote et des facteurs environnementaux sur la compétence vectorielle des vecteurs de maladies zoonotiques en Occitanie.

Mathilde Jaquet^{1,2}; Benjamin Gourbal¹; Olivier Rey¹; Christophe Paupy²; Thierry Lefevre².

¹ Univ. Montpellier, CNRS, IFREMER, UPVD, IHPE, F-66000 Perpignan, France

² MIVEGEC, IRD, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France.



Perspectives

- Evaluer l'effet des différents traitements sur la prévalence de l'infection par des arbovirus
- Evaluer les taux d'infection et de dissémination suite aux différents traitements

Références : S. Gervasi et al., Trends in Parasitology 31, 419 (2015); N. A. Broderick et al., mBio 5, e01117 (2014); S. R. Kennedy et al., Mol Ecol 29, 1001 (2020); T. Lefèvre et al., PLoS Pathogens 9, 6 (2013); D. F. Hien et al., PLoS Pathogens 12, 8 (2016); F. Almiré et al., PLoS Pathogens 17, 9 (2021).

Ces travaux sont financés par :



Annexe n°5

Présentation de poster : congrès ESOVE 2024

Unravelling the Impact of Plant-Based Diets on *Aedes albopictus* Mosquitoes and Arboviral Transmission in Occitanie

Mathilde Jaquet; Davy Jiolle, Olivier Rey, Benjamin Gourbal, Christophe Paupy, Thierry Lefevre

Accumulating evidence suggests that the diet of mosquitoes, particularly those derived from plants, may significantly impact their biology. These meals can influence various aspects of mosquito fitness, such as survival and fecundity, as well as their vector competence for pathogens. However, the precise mechanisms underlying the plant-mediated effects on vector capacity to transmit pathogens remain unknown.

In light of global changes and the shifting spread of arboviruses in Europe, including the south of France, where autochthonous cases of chikungunya and dengue are on the rise, we hypothesize that specific plants growing in Occitanie (South of France) could influence the vector competence of *Aedes albopictus*.

To test this hypothesis, we exposed newly emerged *Ae. albopictus* females for 5 days to different plant species (*Lavandula angustifolia*, *Perovskia atriplicifolia*, *Scabiosa atropurpurea*), and to water and sucrose solution as controls. Females were then subsequently challenged with chikungunya (CHIKV) and dengue (DENV) viruses using oral experimental infection procedures. Females that ingested a complete infectious blood meal (composed of viruses and blood erythrocytes) were then incubated for 7 and 14 days post infection (dpi). At each time point post-infection, 20-30 per condition were analysed using qPCR to detect and quantify viral genomes in their bodies (abdomen+thorax) and heads, respectively, to approximate the infection (IR) and the dissemination (DR) rates as proxies of the vector competence.

Our initial results showed significant effects of mosquito diet on the vector competence, depending on the time points (7 vs. 14 dpi), the virus (DENV vs. CHIKV) and the tissue (body vs. head), but will need to be repeated to confirm them. These preliminary results suggest that plant species in Occitanie might have an impact on the vector competence of *Ae. albopictus*, which could warrant further investigation before considering implications for managing local arboviral transmission.

Unravelling the Impact of Plant-Based Diets on *Aedes albopictus* Mosquitoes and Dengue Transmission



Mathilde Jaquet^{1,2}; Davy Jiolle²; Isabelle Conclois²; Olivier Rey¹; Benjamin Gourbal¹; Christophe Paupy²; Thierry Lefèvre²

mathilde.jaquet@univ-perp.fr

¹ UPVD, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, IHPE, F-66000 Perpignan, France

² MIVEGEC, IRD, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France

CONTEXT & AIMS

- Female mosquitoes readily ingest sugars from a wide range of plant species in addition to blood meals. Whether natural plant diversity affects mosquito competence for arboviruses through toxic secondary metabolites and/or nectar nutritional properties remains to be discovered

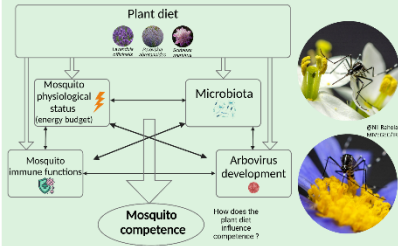


Figure 1: Complex mediation of plant diet on mosquito competence for arboviruses
Goal: Quantifying the vector competence of *Aedes albopictus* mosquitoes following different diets

METHODS

1st experiment: daily monitoring of mosquito survivorship for 15 days + proportion of sugar-positive mosquitoes after 48h of diet

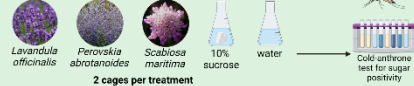


Figure 2: Experimental protocol - Evaluation of plant diet on mosquito survivorship and on their motivation to take sugar meals

2nd experiment: experimental infection - daily monitoring of survivorship + blood feeding-rate, bloodmeal size (pictures of engorged mosquitoes), infection rate (qPCR on bodies), dissemination rate & efficiency (qPCR on heads), transmission rate & efficiency (titration assay)

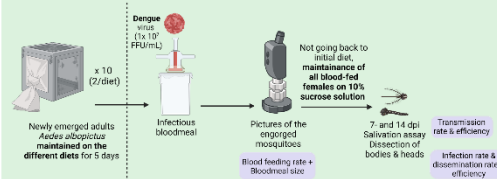


Figure 3: Experimental protocol - Evaluation of a PROPHYLACTIC effect of the diet

Vector competence traits for arboviruses:

$$\text{Infection rate} = \frac{\text{number of qPCR positive bodies}}{\text{total number of tested individuals}}$$

$$\text{Dissemination rate} = \frac{\text{number of qPCR positive heads}}{\text{number of qPCR positive bodies}}$$

$$\text{Dissemination efficiency} = \frac{\text{number of qPCR positive heads}}{\text{total number of tested individuals}}$$

$$\text{Transmission rate} = \frac{\text{number of titration positive saliva}}{\text{number of qPCR positive heads}}$$

$$\text{Transmission efficiency} = \frac{\text{number of titration positive saliva}}{\text{total number of tested individuals}}$$

RESULTS

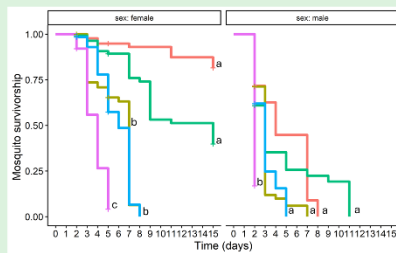


Figure 4: The effect of the diets on the survivorship of *Aedes albopictus* males and females.

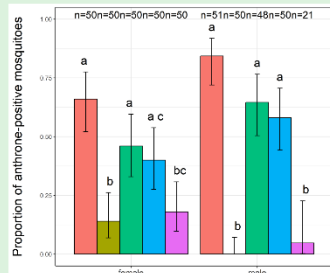


Figure 5: Proportion of *Aedes albopictus* (males and females) tested positive for sugar after exposure to one of five diets for 48 h.

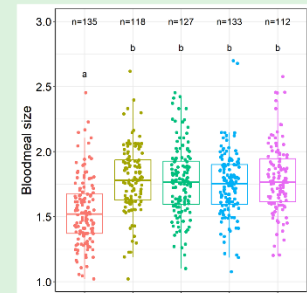
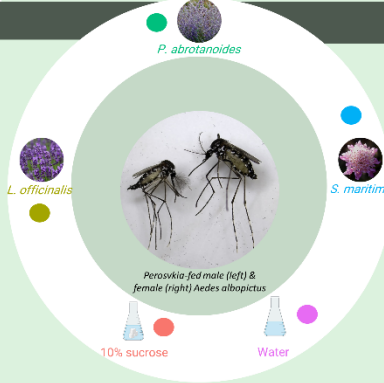


Figure 6: The effect of the diets on the subsequent bloodmeal size taken by *Aedes albopictus*.

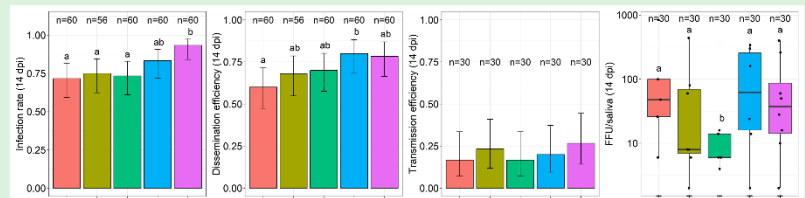


Figure 7: The effect of diets on dengue virus (i) infection rate, (ii) dissemination efficiency, (iii) transmission efficiency and (iv) the number of viral particles capable of replicating in cell cultures

Different letters in the graphs denote statistically significant differences based on multiple pairwise post-hoc tests. FFU (Fluorescent Focus Unit): measures the number of viral particles capable of forming foci under a fluorescence microscope, revealing infected cells.

CONCLUSIONS

- Diet influences mosquito survival and their willingness to sugar feed (variation in nectar content/attractiveness between plant species?)
- Diet also influences the bloodmeal size which could have an effect on the vector competence → 10% sucrose led to a smaller bloodmeal and to a smaller infection rate + dissemination rate than water (due to a smaller viral dose ingested?)
- Differences in the infection rate and dissemination efficiency between diets but not in the transmission efficiency... → Pre-infection diet might have an effect on the virus dynamic within the mosquito?

PERSPECTIVES

- Repeat the salivation assay at 7 and 14 dpi to increase sample sizes and get more robust results
- Digging into the involved mechanisms: can plant-derived sugars influence competence through nonexclusive effects on microbiota (metabarcoding), immune response (transcriptomics) or toxic secondary metabolites (LC-MS)?
- Here we report a prophylactic effect of the plant diet on mosquito competence for DENV. We could expect stronger effects of diet on competence when mosquitoes are reassigned to their treatment following infectious bloodmeal (i.e. therapeutic effects)
- Characterise the nectar content and composition; and measure plant attractiveness to mosquitoes using behavioural assays

References : Lefèvre et al., PLoS Pathog (2013); Wei Xiang et al, Proc Natl Acad Sci (2022); Hien et al. PLoS Pathogens (2016); Kramer et al., Curr Opin Virol (2015)



UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER



Annexe n°6

Formations suivies

Catégorie : module obligatoire (48h)

- **Semaine d'intégration 2021** (15 novembre 2021 - 19 novembre 2021) UPVD - 30 heures enregistrées par : Energie et Environnement.
- **MOOC - Formation à l'intégrité scientifique** (01 octobre 2019 - 17 août 2021) MOOC - Cours d'enseignement diffusé sur internet - 18 heures enregistrées par : Energie et Environnement.

Catégorie : Accompagnement de la thèse (18h)

- **Atelier LaTeX** (09 décembre 2021 - 15 février 2022) 10h à 12h en salle F208 UPVD - 4 heures enregistrées par : Energie et Environnement.
- **Développer des stratégies et tactiques de lecture efficaces** (25 janvier 2022) en ligne - 7 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon. La formation participe à l'objectif suivant : être directement utile pour la rédaction de la thèse ou pour l'exposition écrite ou orale des travaux de recherche.
- **Stress et doctorat : comment vous en sortir ?** (10 mars 2022) en ligne - 7 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon. La formation participe à l'objectif suivant : préparer le devenir professionnel des doctorants dans le secteur public comme dans le secteur privé.

Catégorie : Ouverture scientifique et culturelle (52h)

- **Partage des Sciences** (27 juin 2022 - 28 juin 2022) UPVD - Bibliothèque Universitaire - salle bleue (2ème étage) – Module 1 : Formation à la médiation scientifique - 14 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon.
- **Partage des Sciences** (15 octobre 2022) UPVD - Bibliothèque Universitaire - salle bleue (2ème étage) – Module 2 : Mise en application via un projet de médiation - Créer, animer et participer à un atelier scientifique dans le cadre de la fête de la science. - 8 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon.
- **Fête de la science 2022 et 2023** (octobre 2022/2023) : création, mise en place et animation d'un atelier destiné au grand public sur le thème de la bilharziose - 16 heures enregistrées par : Energie et Environnement.

- **Présenter ses résultats en anglais** : discours, comm visuelle, comm orale (préparation aux congrès internationaux / webinaires) (17 octobre 2023 - 24 octobre 2023) en ligne - 14 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon.

Catégorie : Pratiques pédagogiques pour l'université (7h)

- **Préparer des supports visuels pédagogiques** (08 mars 2022 - 8 mars 2022) en ligne - 7 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon.

Catégorie : Outils scientifiques et techniques (10h)

- **Bio-informatique & Sciences de l'Environnement** : Exploration de la Diversité Taxonomique des Ecosystèmes par Metabarcoding - CNRS (05 septembre 2022 - 9 septembre 2022) CNRS, ANF à Carry-le-Rouet - 10 heures enregistrées par : Energie et Environnement.

Catégorie : Ouverture pluridisciplinaire (10h)

- **Ecole d'été Biodiversité & Vecteurs** (20 septembre 2022 - 23 septembre 2022) RIVOC, Le Sambuc (Tour du Valat) - 10 heures enregistrées par : Energie et Environnement.

Catégorie : Préparation à l'après-thèse (20h)

- **Cross-Border Doctorials 2023** (11 octobre 2023 - 13 octobre 2023) Mas des Sables, Aigues-Mortes (Gard) - 20 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon.

Catégorie : Communication (15h)

- **Congrès ICOPA Copenhague – Poster** (21 août 2022 - 27 août 2022) World Federation of Parasitologists, Copenhague - 5 heures enregistrées par : Energie et Environnement.
- **Congrès des doctorants de l'UPVD – Poster** (18 novembre 2022) UPVDoc, Perpignan
- **Deuxième soirée du MICROCLUB – Présentation orale** (05 juin 2024) - 10 heures enregistrées par : Energie et Environnement
- **Assemblée Générale RIVOC – Présentation orale** (24 juin 2024)
- **Congrès ESOVE Montpellier – Poster** (14 octobre 2024 – 17 octobre 2024)

Abstract

In light of the significant increase in the emergence and re-emergence of infectious diseases worldwide, it is crucial to understand the factors involved in these events. Among these factors, food resources and the microbiome appear central in the tripartite relationship composed of the host, the pathogens it transmits, and the environment. Thus, the objective of this thesis was to identify the links between biotic and abiotic environmental factors, the microbiome, and vector competence in mollusks and arthropods that vector zoonotic diseases. This research has enhanced our understanding of the bacterial communities within the microbiome of natural populations of *Bulinus truncatus* and *Galba truncatula*, and has studied the influence of environmental factors and host genetics on these communities. It has also evaluated the link between plant-based food resources and the vector competence of laboratory populations of *Aedes albopictus*. These studies provide new and relevant insights into how interactions between the environment, the microbiome, and host vector competence can influence the transmission dynamics of infectious diseases, offering perspectives for managing infectious diseases and identifying high-risk areas for emergence.

Key words: emergence, biotic and abiotic environmental factors, vector competence, microbiota, *Bulinus truncatus*, *Galba truncatula*, *Aedes albopictus*, fasciolosis, schistosomiasis, chikungunya, dengue

Résumé

Face à la forte augmentation des émergence et ré-émergences de maladies infectieuses au niveau mondial, il est crucial de comprendre les facteurs impliqués dans ces événements. Parmi ceux-ci, la ressource alimentaire et le microbiote apparaissent centraux dans le triptyque composé de l'hôte, des pathogènes qu'il transmet et de l'environnement. Ainsi, les travaux présentés dans cette thèse ont eu pour objectif d'identifier les liens entre facteurs environnementaux biotiques et abiotiques, microbiote et compétence vectorielle chez des mollusques et des arthropodes vecteurs de zoonoses. Ces recherches ont permis d'accroître les connaissances sur les communautés bactériennes appartenant au microbiote de populations naturelles de *Bulinus truncatus* et de *Galba truncatula*; ainsi que d'étudier l'influence des facteurs environnementaux et de la génétique sur ces dernières. Elles ont également permis d'évaluer le lien entre ressource alimentaire végétale et compétence vectorielle de populations de laboratoire d'*Aedes albopictus*. Ces études apportent des éléments nouveaux et pertinents pour mieux comprendre les interactions entre environnement, microbiote et compétence vectorielle des hôtes, offrant ainsi des perspectives pour la gestion des maladies infectieuses/ou des zones à risques d'émergence.

Mots clés : émergence, facteurs environnementaux biotiques et abiotiques, compétence vectorielle, microbiote, *Bulinus truncatus*, *Galba truncatula*, *Aedes albopictus*, fasciolose, bilharziose, chikungunya, dengue