INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Généralités sur les Schistosomatidae

1.1.1. Définition et systématique

Les Schistosomes sont des Trématodes dioïques à dimorphisme sexuel prononcé. Ce sont avant tout des parasites des endothéliums du système vasculaire de leurs hôtes définitifs. Les représentants de la famille des Schistosomatidae Stiles et Hassall, 1898 sont filiformes, aussi bien chez le mâle que chez la femelle, par opposition aux autres SCHISTOSOMATOIDEA à l'aspect foliacé. Espèces parasitant aussi bien les sauropsidés que les mammifères, le mâle présente généralement un canal gynécophore dans lequel vient se loger la femelle. Le genre type de la famille est le genre *Schistosoma* Weinland, 1858, parasite de mammifères.

Pour certains auteurs, la nature de l'hôte paraissait essentielle dans la systématique, avec deux familles, la famille des Schistosomatidae comprenant les parasites de mammifères et la famille des Ornithobilharziellidae avec les espèces inféodées aux oiseaux (Azimov et Ibadullaev, 1970). Cette notion fut très vite abandonnée par la suite. Actuellement le consensus sur la systématique des Schistosomatidae repose sur la présence d'un canal gynécophore bien développé (Schistosomatinae) ou réduit voire absent (Bilharziellinae, Gigantobilharziinae). Au total 13 autres genres sont reconnus par Khalil *et al.*,(2002). Le statut du genre *Griphobilharzia* défini par Platt, Blair, Purdie et Melville, 1991 suite à la description de *G. amoena* chez des crocodiles est sujette à discussion. Sa position au sein des Schistosomidae est réfutée d'après les analyses phylogénétiques (Brant *et al*., 2006 ; Loker et Brant, 2006). Aussi nous ne retiendrons que les 13 genres ci-dessous :

- *Schistosoma* Weinland, 1858 (parasites de mammifères)
- *Schistosomatium* Tanabe, 1923 (parasites de rongeurs, Amérique du Nord)
- *Heterobilharzia* Price, 1929 (parasites de mammifères, Amérique du Nord)
- *Bivitellobilharzia* Vogel et Minning, 1940 (parasites d'éléphants, Afrique et Asie)
- *Austrobilharzia* Johnston, 1917 (parasites d'oiseaux)
- *Orientobilharzia* Dutt et Srivastava, 1955 (parasites de mammifères, Asie)
- *Ornithobilharzia* Odhner, 1912 (parasites d'oiseaux)
- *Macrobilharzia* Travassos, 1922 (parasites d'oiseaux, Nouveau monde)
- *Bilharziella* Looss, 1899 (parasites d'oiseaux, Ancien monde)
- *Trichobilharzia* Skrjabin et Zakharow, 1920 (parasites d'ansériformes, espèces cosmopolites)
- *Jilinobilharzia* Liu et Bai, 1976 (parasites d'ansériformes, Asie)
- *Giganthobilharzia* Odhner, 1910 (parasites d'oiseaux, cosmopolites)
- *Dendritobilharzia* Skrjabin et Zakharow, 1920 (parasites d'ansériformes, cosmopolites).

Les approches phylogénétiques sur des données moléculaires tendent à exprimer les liens qui existent entre les très nombreuses espèces qui composent ce groupe (Littlewood et Johnston, 1995). La première représentation de Snyder et Loker (2000) reconnaît deux clades principaux : le premier comprenant les parasites de mammifères avec les genres *Schistosoma* et *Orientobilharzia*, et le second comprenant tous les Schistosomes aviaires (*Ornithobilharzia*, *Austrobilharzia*, *Bilharziella*, *Dendritobilharzia*, *Gigantobilharzia*, *Trichobilharzia*) mais aussi des parasites de mammifères (*Heterobilharzia* et *Schistosomatium*), ce qui tend à annoncer la paraphylie des Schistosomes aviaires (Figure1).

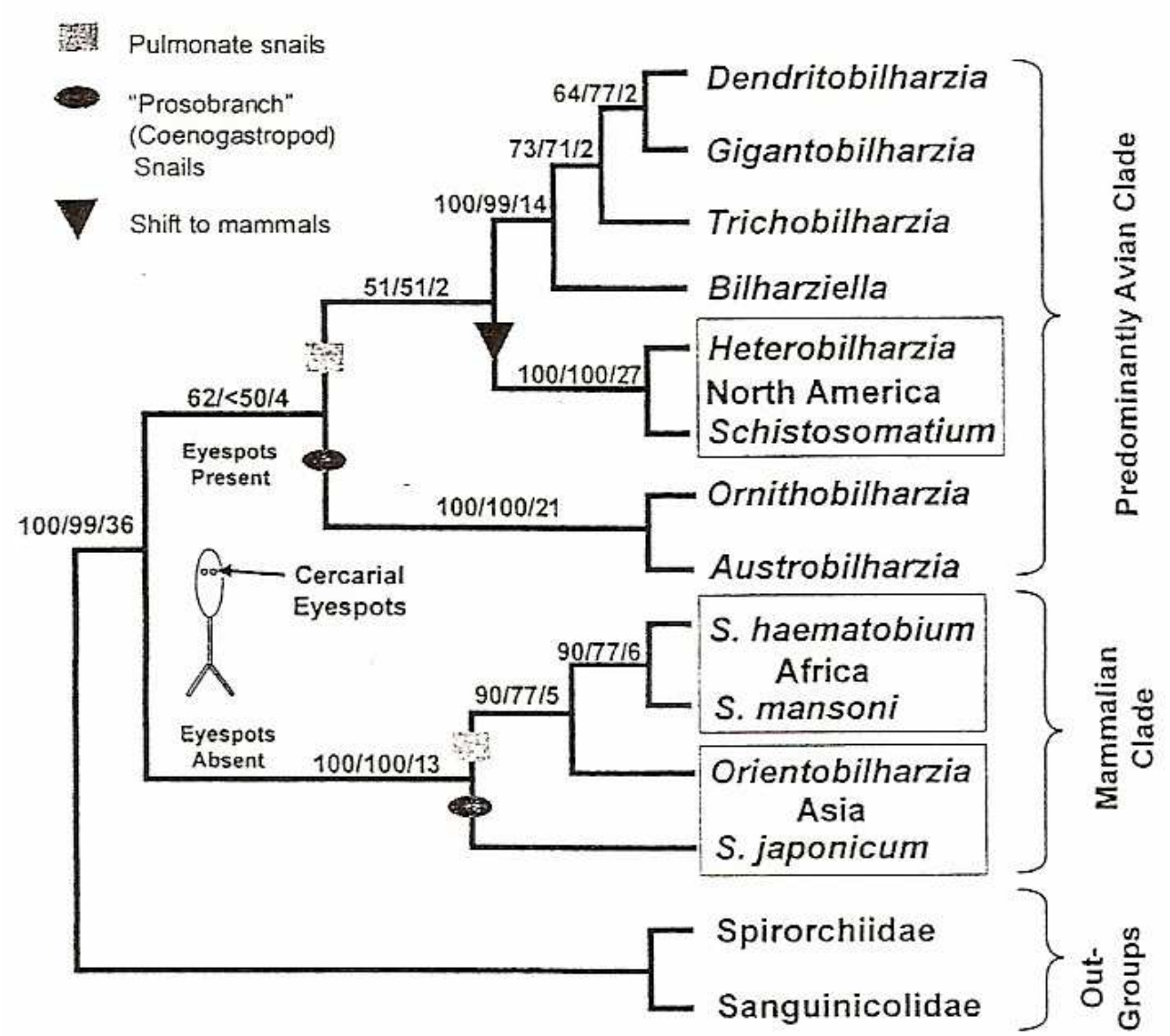


Figure 1 : Arbre phylogénétique en Maximum de Parcimonie basé sur l'analyse d'une partie de la grande sous-unité de l'ADNr, enraciné sur les Spirorchiidae et les Sanguinicolidae, et représentant les relations phylogénétiques au sein de la famille des Schistosomatidae (d'après Snyder et Loker, 2000)

En 2003, Lockyer *et al.* confirment ces résultats préliminaires tout en rejetant l'hypothèse selon laquelle le groupe [*Schistosoma-Ornithobilharzia*] serait groupe frère de tous les autres Schistosomatidae. Le genre *Schistosoma* est paraphylétique et, à partir d'une origine asiatique, sa dispersion a conduit aux espèces indiennes et africaines (Figure 2).

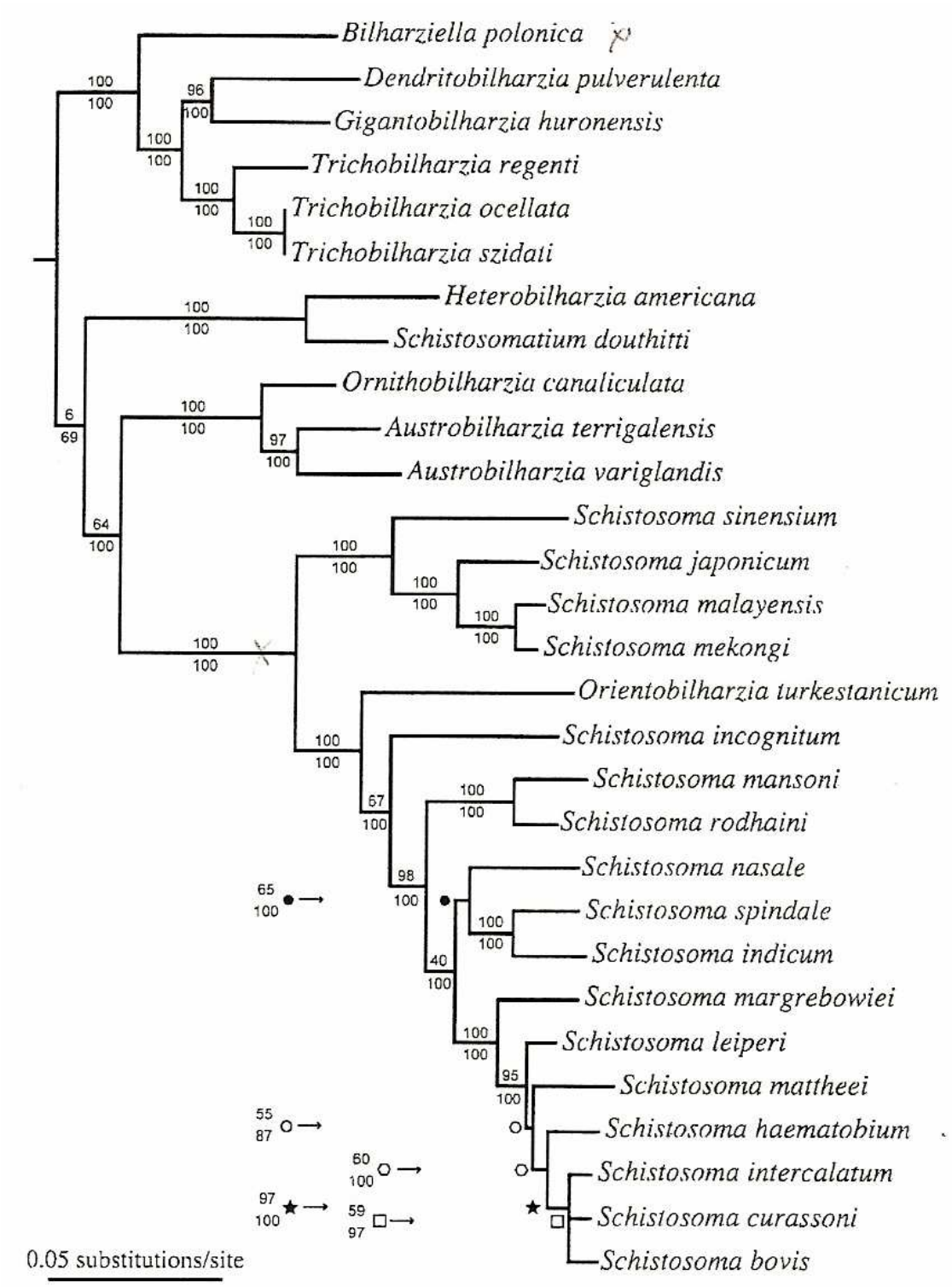


Figure 2 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance basé sur l'analyse combinée de la petite et grande sous-unités de l'ADNr et du domaine Cox1 de l'ADNm, représentant les relations phylogénétiques des Schistosomatidae (d'après Lockyer *et al.*, 2003).

Par la suite, des analyses incorporant un nombre plus important de taxons (« in group » et « outgroup ») exprimeront des relations phylogénétiques, entre les principaux clades, identiques à celles décrites précédemment : paraphylie des Schistosomes inféodés aux mammifères avec isolement d'un clade strictement asiatique et paraphylie des Schistosomes aviaires (Figures 3 et 4) (Snyder, 2004; Brant, 2007). Ainsi, la notion dichotomique selon la nature du compartiment hôte (Mammifères, Oiseaux) maintenue par Azimov (1975) n'est plus supportée.

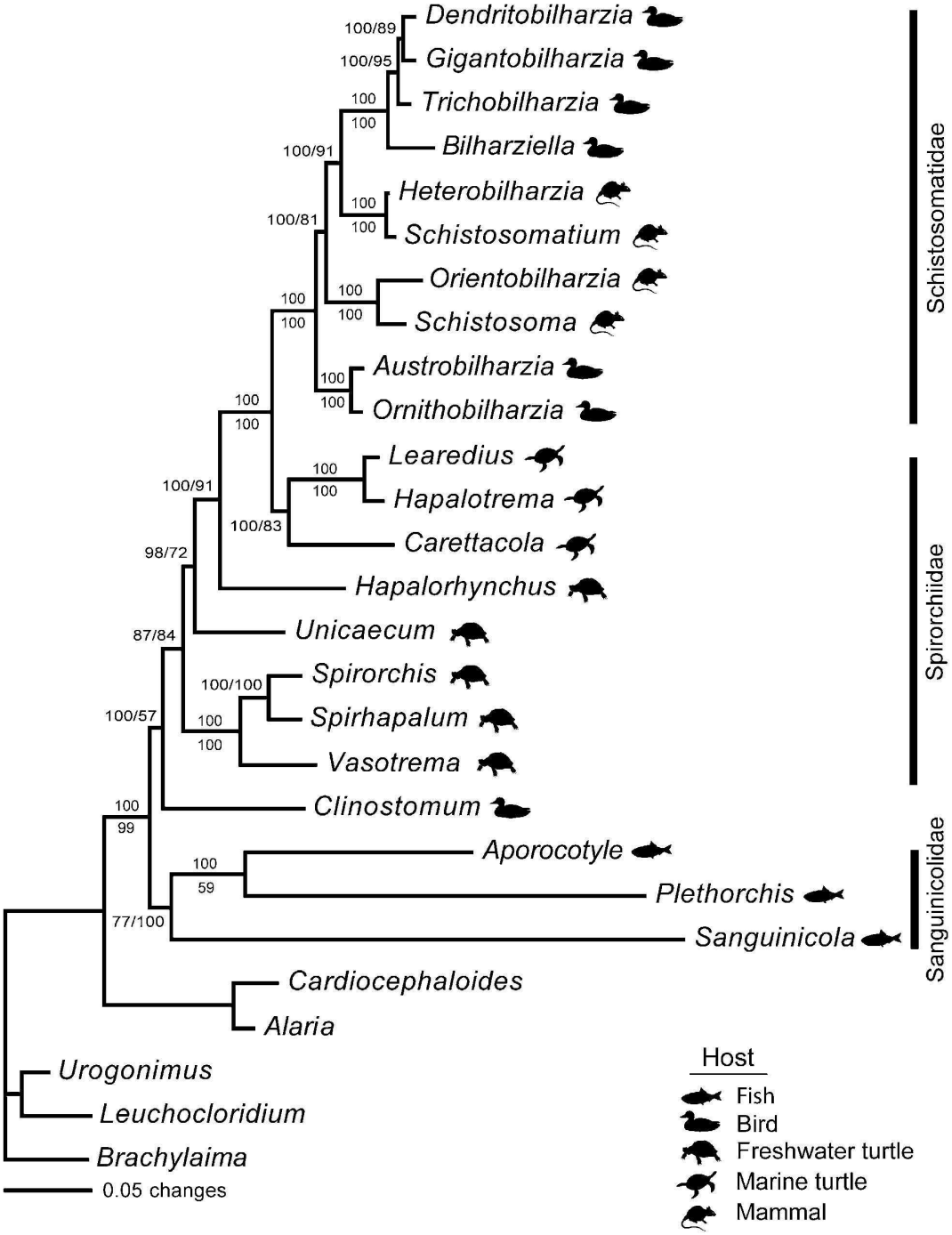


Figure 3 : Phylogramme basé sur l'analyse en Inférence Bayesienne de la petite et grande sous-unité de l'ADNr, représentant les relations phylogénétiques pour la famille des Schistosomatidae (d'après Snyder, 2004)

Figure 4: Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance basé sur une partie de la région ITS. Chaque taxon est suivi par sa localisation géographique (Europe, DE = Allemagne, NL = Pays-Bas, CZ = République Tchèque, IC = Islande; USA, NM = Nouveau Mexique, NV = Nevada, MI = Michigan) (d'après Brant, 2007)

1.1.2. Cycle de développement

Le cycle de développement des Schistosomes est dixène. Il comprend un hôte intermédiaire (mollusque) et un hôte définitif (vertébré) (Figure 5).

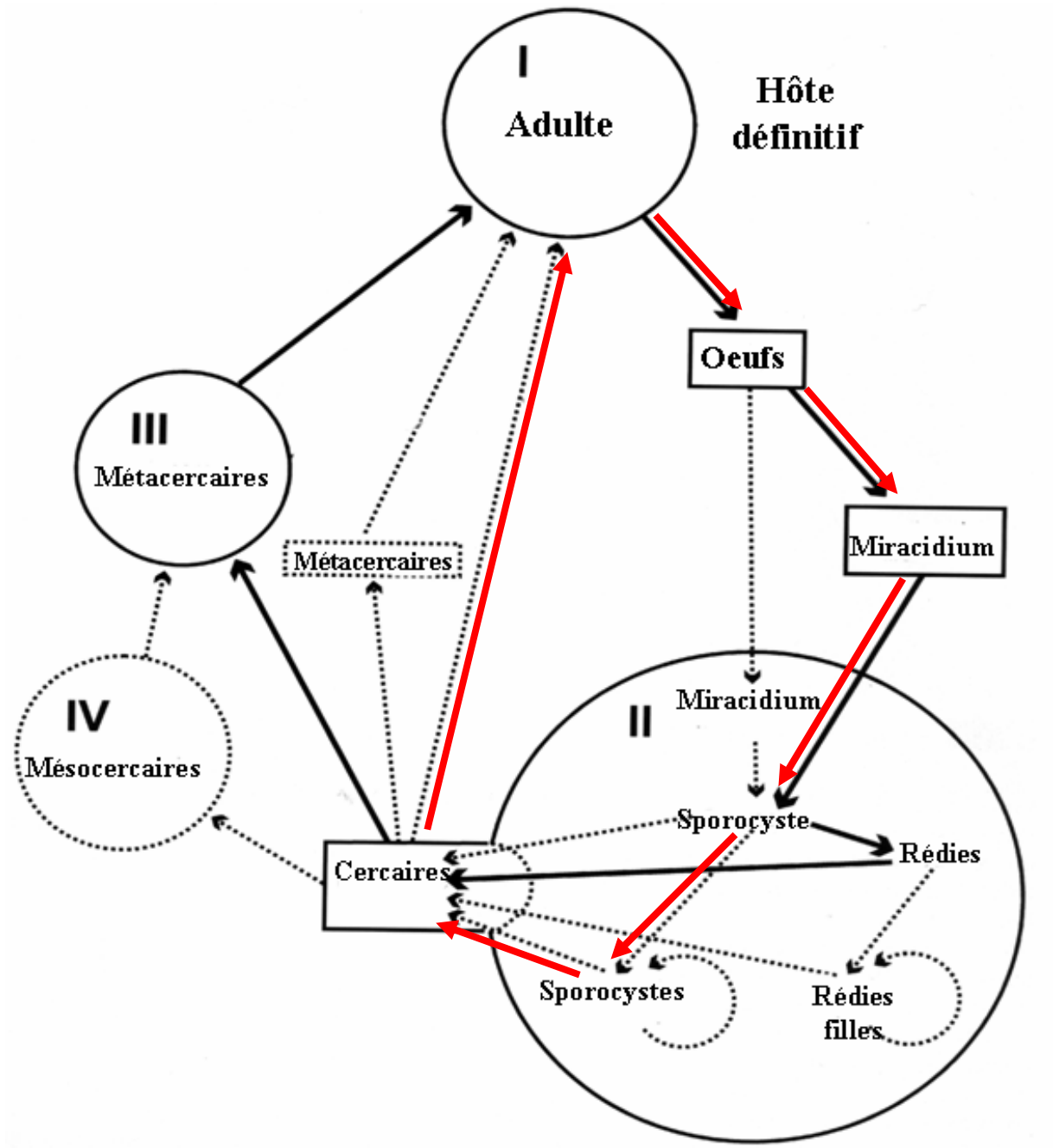


Figure 5 : Cycle synthétique du développement des Trématodes (d'après Bush *et al.*, 2001)
(en rouge : cycle des Schistosomatidae)

La stricte notion d'hôte définitif à sang chaud a été controversée lors de la mise en évidence de *Griphobilharzia amoena* chez des crocodiles. Mais l'appartenance de cette espèce aux Schistosomatidae doit être abandonnée (Loker et Brant, 2006). Les adultes males et femelles se logent dans le système veineux de différents organes (mésentère, foie, intestin, vessie, système nerveux) suivant les espèces. Après accouplement, la femelle pond des œufs qui vont traverser par effraction les muqueuses pour être excrétés dans le milieu extérieur. Les œufs sont embryonnés et contiennent une larve ciliée appelée miracidium. Une fois libérée, celle-ci va nager et pénétrer chez un mollusque. Il va se transformer pour devenir un sporocyste de première génération, puis de seconde génération, voire de troisième génération, à l'intérieur duquel se forment les cercaires. Leur devenir dépend de la recherche et de la pénétration par passage transcutané chez un hôte définitif. Après pénétration le parasite subit des modifications biochimiques et morphologiques pour atteindre le stade schistosomule qui migrera, le plus souvent par voie sanguine, vers l'organe cible où s'effectuera sa maturation en adulte.

1.2. Les Schistosomes aviaires

1.2.1. Systématique

Les espèces représentées et documentées en Europe, chez des hôtes trouvés naturellement infestés en conditions naturelles, appartiennent aux genres *Dendritobilharzia*, *Bilharziella* et *Trichobilharzia*, précédemment cités, auxquels s'ajoute une espèce signalée en Islande chez le Cygne chanteur et appartenant à un nouveau genre, le genre *Allobilharzia* (Kolářová *et al.*, 2006).

Au sein du genre *Dendritobilharzia*, seul est reconnu en Europe *D. pulverulenta* (Braun, 1901), bien que d'autres taxons aient été proposés en Asie et dans le Nouveau Monde (Mehra, 1940; Cheatum, 1941; Freitas et Costa, 1972; Martorelli, 1981). Pour ces derniers, la création de nouvelles espèces sur des critères uniquement morphologiques, mêmes avancés, semble difficile (Macko, 1959; Ulmer et van de Vusse, 1970; van de Vusse, 1980).

Bilharziella polonica (Kowalewski, 1895) est reconnu actuellement comme la seule espèce du genre établi par Looss en 1899. La mise en synonymie du genre *Chinhuta* Lal, 1937 est actuellement admise (Khalil *et al.*, 2002), de même que la mise en synonymie des espèces *C. indica* Lal, 1937 et de *Bilharziella lali* Baugh, 1963 avec *B. polonica*.

Sur la base des caractères morphologiques, la diagnose des parasites du genre *Trichobilharzia* est la suivante : les adultes, males et femelles, sont filiformes. Les deux sexes possèdent chacun deux ventouses et un corps dont l'extrémité postérieure est spatulée. Le canal gynécophore est court et ne se prolonge pas au niveau terminal du corps. Les testicules, souvent

nombreux, sont situés en aval de ce canal, de part et d'autre du caecum commun. La vésicule séminale est allongée, située à la partie antérieure du corps, entre l'acetabulum et le canal gynécophore. Le male possède également une poche du cirre et un pore génital antérieur au canal gynécophore. La femelle possède un ovaire tubulaire et allongé, en position antérieure, et un réceptacle séminal développé, s'ouvrant immédiatement après cet ovaire. L'ootype est antérieur à l'ovaire, et l'ouverture utérine suit immédiatement l'acetabulum (Farley, 1971; Blair et Islam, 1983 ; Khalil *et al.*, 2002). Au sein des Schistosomatidae, la biogéographie et les phénomènes de capture des différents hôtes ont eu de profondes influences sur l'évolution des caractères morphologiques au sein de la famille (Snyder *et al*., 2001). C'est au sein de ce genre que le nombre d'espèces décrites est le plus important. L'ensemble des données relatives à ces taxons est bien documenté dans Horák *et al.*, 2002. Si pas moins de 45 espèces sont répertoriées à travers le monde (dont huit nasales et 37 viscérales), seule une espèce nasale et sept espèces viscérales ont été signalées en Europe. Parmi ces espèces, seule l'espèce nasale *T. regenti* Horák, Kolářová et Dvořák, 1998 et quatre espèces viscérales, *T. ocellata* (la Valette, 1855) Brumpt, 1931 ; *T. szidati* Neuhaus, 1952; *T. franki* Müller et Kimmig, 1994 et *T. salmanticensis* Simon-Martin et Simon-Vicente, 1999 sont bien documentées. En revanche le statut des trois dernières, *T. kossarewi* Skrjabin et Zakharow, 1920 ; *T. kowalewskii* (Ejsmont, 1929) et *T. filiformis* (Szidat, 1938), reste incertain. Créé par Ejsmont en 1929, le genre *Pseudobilharzia* fut par la suite mis en synonymie avec le genre *Trichobilharzia* (McMullen et Beaver, 1945). Mais la révision systématique majeure proposée au sein de ce genre est l'abandon de *T. ocellata* au profit de *T. szidati* (Rudolfová *et al.*, 2005) sur la base des taxons émis par *Lymnaea stagnalis* en Europe.

1.2.2. Relations phylogénétiques

Au sein des Schistosomatidae, sur la base des arbres présentés précédemment (Figures 3 et 4), l'ensemble formé par les Schistosomes aviaires présents en Europe est groupe frère du clade formé par les représentants des Schistosomes du Nouveau Monde inféodés aux mammifères et appartenant aux genres *Heterobilharzia* et *Schistosomatium*. Le genre *Trichobilharzia* est monophylétique et groupe frère d'un ensemble formé par *Dendritobilharzia pulverulenta* et *Gigantobilharzia huronensis*. L'utilisation par la suite d'un nombre plus important de taxons appuiera cette monophylie et la position du genre *Allobilharzia* (Kolářová *et al.*, 2006; Brant, 2007) comme groupe frère du genre (Figure 6). Sur la base de toutes ces représentations, la reconnaissance de la sous-famille des Bilharziellinae Price, 1929 ne se justifie pas au même titre que l'inclusion de celle des Griphobilharziinae dans les Schistosomatidae.

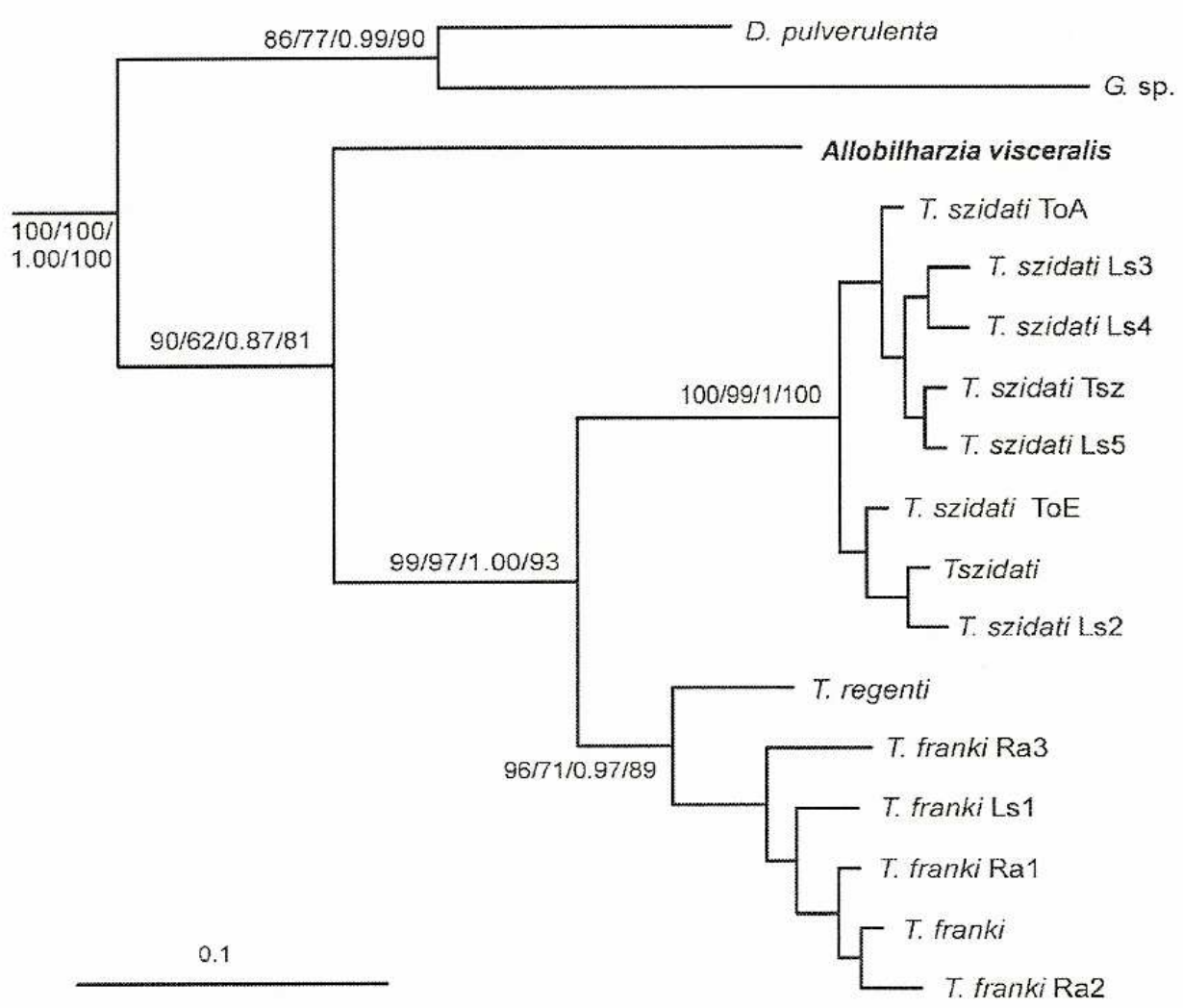


Figure 6 : Arbre phylogénétique par méthode Bayésienne basé sur les séquences partielles des espaces internes transcrits (ITS) des Schistosomes aviaires des genres *Dendritobilharzia, Gigantobilharzia, Trichobilharzia* et *Allobilharzia* (d'après Kolářová *et al.*, 2006)

1.2.3. Trichobilharzies et hôtes définitifs

La nature des hôtes définitifs comprend l'ensemble des oiseaux aquatiques, principalement d'eau douce (Ansériformes : canards, Oies, Cygnes ; Podicipédiformes : Grèbes ; Ciconiiformes : Hérons), et plus rarement marins (Charadriiformes : Scolopacidés, Laridés ; Procellariformes : Puffins ; Pélécaniformes : Cormoran) (Yamaguti, 1971). A ce spectre d'hôtes s'associent des représentants des Passériformes tels que le Corbeau (Corvidae) et plus récemment la Bergeronnette grise (*Motacilla alba*) (Rudolfová *et al.*, 2006).

Si, chez les Schistosomes aviaires, la localisation préférentiellement explorée fut le système veineux de la sphère intestinale et hépatique, d'autres organes peuvent héberger ces parasites, en particulier les cavités nasales. Fain découvrit pour la première fois des Trichobilharzies au niveau des fosses nasales d'oiseaux africains naturellement infestés. Au total, il reconnut 5 espèces : *T.*

nasicola, *T. rodhaini*, *T. spinulata*, *T. aureliani*, *T. duboisi* (Fain, 1955a; Fain, 1955b; Fain, 1955c; Fain, 1955e; Fain, 1956a; Fain, 1956c; Fain, 1959). En Australie la première mention d'un parasite nasal fut signalée par Bearup (1957) suite à la découverte d'œufs, initiant ainsi une recherche systématique dans l'avifaune locale (Blair et Ottesen, 1979). Plus tard, Blair et Islam (1983) et Islam (1986), décrivirent deux espèces nasales, *Trichobilarzia australis* et *T. arcuata*, sur du matériel également obtenu à partir d'animaux naturellement infestés. Aucune espèce nasale ne fut signalée dans le Nouveau Monde, et la première description d'une espèce européenne, *T. regenti*, fut le résultat d'une infestation expérimentale sur Colvert, *Anas platyrhynchos* et Canard musqué, *Cairina moschata* (Horák *et al.*, 1998). Auparavant, Palmer et Ossent (1984) avaient mis en évidence des parasites au niveau nasal chez des Cygnes tuberculés (*Cygnus olor*) au niveau des lacs alpins. Plus tard, des Anatidés [Colvert, Fuligule morillon (*Aythya fuligula*), Fuligule milouin (*Aythya ferina*) et Souchet (*Anas clypeata*)] furent trouvés naturellement infestés par des Trichobilharzies nasales (Rudolfová *et al.*, 2002) et identifiés moléculairement (Picard et Jousson, 2001; Rudolfová *et al.*, 2007). La présence de Bilharzies nasales fut aussi observée en Islande chez le Colvert (Skírnisson et Kolářová, 2008).

Concernant les espèces viscérales, les données morphologiques de *T. szidati*, *T. franki* et *T. salmanticensis* ont été définies sur la base d'exemplaires obtenus expérimentalement après infestations chez le Colvert, permettant l'assise de leur statut de nouvelles espèces. En conditions naturelles, des Colverts furent trouvés parasités aussi bien par *T. franki* que *T. szidati*, cette dernière espèce étant également présente chez la Sarcelle d'hiver, *Anas crecca* (Rudolfová *et al.*, 2007). Chez le Cygne chanteur, *Cygnus cygnus*, l'espèce viscérale, *Allobilharzia visceralis*, est parfaitement documentée (morphologie des adultes et des œufs, reconnaissance des mollusques hôtes intermédiaires, homologie moléculaire des différents stades du parasite) (Kolářová *et al.*, 2006). Toutefois, la création de ce nouveau taxon fut réalisée sans évocation de *Trichobilharzia filiformis* (Szidat, 1938), jusqu'alors seule espèce décrite et signalée chez des représentants du genre *Cygnus* (Cygne tuberculé, *Cygnus olor*).

En conclusion, au sein du genre *Trichobilharzia*, l'identification des espèces sur des critères purement morphologiques reste délicate, et pour un grand nombre d'entre elles, les descriptions apparaissent insuffisantes pour identifier les taxons en s'appuyant uniquement sur la nature de l'hôte définitif. En effet, cette notion (d'hôte définitif) est parfois arbitraire, la présence du parasite étant le résultat d'infestations en conditions expérimentales. Il devient alors difficile de statuer sur l'hôte type en condition naturelle. De plus, les phénomènes migratoires liés à l'avifaune laissent supposer que les localités types, aussi bien pour les parasites adultes que pour les stades larvaires,

sont sujettes à discussion quant à l'obtention de topotypes et la clarification du statut de certains taxons. L'association des approches morphologiques et moléculaires semble donc être l'outil essentiel à la reconnaissance de nouvelles espèces, de même que l'étude de leur circulation au travers des différents compartiments hôtes, au risque, dans des révisions systématiques futures, d'ignorer certains taxons précédemment décrits, par défaut d'informations disponibles.

1.3. Relations Trématodes – Hôtes intermédiaires

1.3.1. Phénomènes de spécificité et d'adaptation

Llewellyn montra en 1957 que la présence de niches écologiques ne rassemblant qu'un seul type d'hôte semble être un facteur suffisant à l'établissement d'une spécificité chez les monogènes. Dans le cas où l'hôte définitif peut se déplacer dans des endroits géographiquement distincts, et lorsque cet hôte est porteur d'un parasite possédant une durée de vie longue, il existe de grandes chances pour que ce parasite puisse infester d'autres hôtes intermédiaires en relarguant ses œufs dans des sites très différents. Ainsi, par un mécanisme de pression de sélection, il est probable que le parasite rencontrant un mollusque dont les caractéristiques morphologiques et biochimiques sont semblables à celles de son hôte naturel, pourra poursuivre normalement son développement. Pour cela, le nouvel hôte devra également se trouver dans une niche écologique favorable au parasite. Toutefois, si les deux types d'hôtes sont présents sur le même site, l'hôte naturel restera vraisemblablement celui chez qui le parasite se développera prioritairement. Un cas similaire fut observé chez *Fasciola hepatica* qui, en l'absence de son hôte définitif naturel, a été retrouvé chez une autre espèce de *Lymnaea* où il a poursuivi son développement (Wright, 1960).

Kock (2001) constate avec *T. ocellata* (= *T. szidati*) et *T. franki* que le pouvoir attractif et infestant s'orientent respectivement vers *Lymnaea stagnalis* et *Stagnicola palustris* et vers les mollusques du gerne *Radix* (*auricularia* principalement et éventuellement *ovata*). Ceci permet d'envisager que les espèces décrites comme appartenant au groupe *ocellata-szidati* retrouvées sur *Radix* ou sur des espèces autres que *L. stagnalis* dans le passé appartiendraient probablement à d'autres espèces de Schistosomes aviaires, notamment celles décrites comme *T. szidati* par Neuhaus en 1952 sur *R. ovata*; hypothèse peu envisageable compte tenu de la seule identification des cercaires et du fait de l'utilisation de *L. stagnalis* comme unique modèle expérimental. Il semble donc plus probable qu'il s'agisse en fait d'une espèce différente de type *regenti* ou *franki* (Kock, 2001).

D'autres phénomènes d'adaptation peuvent apparaître, liés à des facteurs tels que le stade de maturité du mollusque (âge et taille) ou les conditions environnementales auxquelles sont soumis les mollusques (pollution, nourriture) (Dreyfuss *et al.*, 2000 ; Belfaiza *et al.*, 2004).

1.3.2. Phénomènes d'exclusion et de facilitation

Dans le couple Mollusque / Trématode peuvent apparaître des phénomènes d'exclusion et de facilitation faisant intervenir chez l'hôte des mécanismes de résistance (naturelle ou acquise) liés au système immunitaire. Deux types de réactions co-existent lors de l'intrusion d'un corps étranger chez le mollusque. Les réactions cellulaires sont caractérisées par un processus de phagocytose, se produisant au niveau de l'hémolymphe (amoebocytes) et dans les tissus, permettant la défense primaire du mollusque face à une agression (Stumpf et Gilbertson, 1978; Lie *et al.*, 1975a ; Lie *et al.*, 1975b ; Lie et Heyneman, 1975; Lie et Heynman, 1976 ; Lie et Heyneman, 1976a ; Lie et Heyneman, 1976b). Tous ces mécanismes aboutissent, dans le cas d'une infestation par un trématode, à des réactions d'encapsulation des miracidiums. Les réactions humorales constituent le système de défense à long terme du mollusque, par des changements biochimiques importants et par la libération de facteurs circulants dont certains possèdent un pouvoir immobilisant sur le parasite (Hosaka et Berry, 1975) ou opsonisant sur la phagocytose (Sminia *et al.*, 1979).

Ainsi, lors d'une pluriinfestation inter ou intra-spécifique chez un mollusque réceptif, pourront survenir une atteinte de la migration du parasite dans les tissus, de la production/émission de cercaires (Joe *et al.*, 1965), ainsi qu'une inhibition totale de développement du second trématode (Lie, 1966). Ce type de réaction dépend alors du temps de latence entre les deux infestations, mais aussi des stades parasitaires mis en jeu (sporocystes, rédies…). Dans le cas d'une résistance naturelle de l'hôte à un parasite, ce dernier sera détruit ou inhibé dès son entrée dans les tissus du mollusque, ou lors des premiers stades de son développement. Le même processus apparaît lors d'une résistance acquise avec une réaction souvent plus rapide que lors de la primo infestation. Toutefois, dans les deux cas, cette résistance ne s'opère qu'envers une seule espèce de parasite et n'intervient pas vis-à-vis d'espèces différentes, mêmes proches. Parfois, le phénomène inverse est observé avec une facilitation d'entrée du second parasite par mobilisation du système immunitaire lors de la première infestation et réduction de la résistance de l'hôte.

Cette compétition importante entre les différents Trématodes provoque donc des phénomènes particuliers chez les mollusques. Une même espèce de mollusque, présente dans un écosystème, pourra héberger une riche xénocommunauté de Trématodes (Combes, 1995). Les phénomènes d'exclusion, même s'ils sont actuellement méconnus, conduisent alors à une hiérarchisation entre ces divers parasites. Ainsi, les Trématodes possédant un stade rédie semblent

mieux armés face à ceux donc l'unique stade larvaire est le sporocyste (Basch *et al*., 1969 ; Donges, 1972). Ces mécanismes ne s'appliquent toutefois qu'aux infracommunautés, n'influant pas à long terme sur les xénocommunautés (pas de disparition d'une espèce au profit d'une seconde) (Sousa, 1990).

Il existe également des mécanismes d'échappement au système immunitaire de l'hôte lors de la transformation du parasite en sporocyste. Durant la phase de pénétration, le parasite va relarguer des composants antigéniques (plaque ciliée, glycocalix) provoquant une réaction immunitaire de l'hôte dirigée contre ces éléments et permettant ainsi au parasite de « disparaître ». Les Trichobilharzies peuvent aussi inhiber les fonctions de défense en présentant à leur surface des saccharides spécifiques (L-fucose, D-galactose). Enfin, le parasite peut stimuler la synthèse, par l'hôte lui-même, de schistosomine et de peptides FMRF-amide (neuropeptides) qui vont bloquer les récepteurs des hormones gonadotropes femelles, bloquant ainsi « l'ovoposition », mais induisant également une modification de synthèse des facteurs de croissance de l'hôte (gigantisme…), l'inhibition des cellules centrales neurœndocrines (action sur l'ovulation et la ponte) et du système de défense (immunosuppression indirecte) (Horák *et al.*, 2002; Schallig *et al.*, 1991).

1.4. Relations Trématodes – Hôtes définitifs

Afin de mieux comprendre le développement du parasite chez son hôte définitif, différentes études expérimentales ont été mises en place, nécessitant le maintient du cycle complet du trématode au laboratoire (Meuleman *et al.*, 1984; Haas et Pietsch, 1991). La transformation du parasite s'accompagne alors de modifications de son tégument externe, permettant l'échappement au système immunitaire. Les cercaires de Trichobilharzies secrètent également des eicosanoides identiques à ceux des Schistosomes humains inhibant l'action des polynucléaires neutrophiles. La réaction immunitaire développée contre les parasites morts au niveau sous-cutané n'a donc aucun effet sur les schistosomules, et les anticorps ne seront sollicités qu'en cas de ré-infestation (Horák et Kolářová, 2000; Horák et Kolářová, 2001; Horák et Kolářová, 2005). Ces schistosomules rejoignent ensuite les vaisseaux sanguins par le biais de facteurs chimiotactiques, mais également de phénomènes de photo-orientation inverse (au niveau cutané) (Grabe et Haas, 2004), puis atteignent les poumons pour y débuter leur différenciation en ver adulte (4ème jour p.i). Celle-ci s'achèvera au 9ème jour dans les différents organes cibles (foie, intestin), à la différence de *S. mansoni* dont les adultes définitifs n'apparaissent qu'au 35ème jour (Clegg, 1965).

Des troubles hépatiques et intestinaux furent décrits en infestation expérimentale (Hoeffler, 1974). Plusieurs autres types de lésions ont pu être observées : endothélites avec infiltration de cellules inflammatoires au niveau sous-endothéliale et formation de granulomes, vascularites

lymphocytaires au niveau de tous les types de vaisseaux, réaction vasculo-exsudative (œdème) au niveau péri-vasculaire, thrombose vasculaire et hyperplasie mésothéliale des séreuses. Des lésions furent également retrouvées au niveau des organes cibles, dues au passage des vers adultes ou des œufs (Levine *et al.*, 1956; Bayssade-Dufour *et al.*, 2002; van Bolhuis *et al.*, 2004; Brant, 2007).

Dans le cas particulier des espèces nasales, la réaction inflammatoire au niveau cutané est identique à celle décrite précédemment pour les espèces viscérales. Après transformation des cercaires en schistosomules, ces dernières vont rejoindre les nerfs périphériques par un phénomène de tropisme, et migrer rapidement au niveau du système nerveux de l'hôte. Ces schistosomules seront retrouvées tout d'abord dans les différentes régions de la moelle épinière, puis au niveau de la *medulla oblongata*. Elles traverseront ensuite les lobes cérébraux pour rejoindre le bulbe olfactif et la cavité nasale. Les voies de migration de ces parasites nasaux sont encore méconnues, bien que la présence de cellules sanguines au niveau de leur tube digestif soit en faveur d'un déplacement par les vaisseaux sanguins cérébraux. Une fois dans les cavités nasales, les schistosomules vont achever leur transformation en vers adultes (Kouřilová *et al*., 2004 ; Horák et Kolářová, 2005 ; Blažová et Horák, 2005 ; Chanová et Horák, 2005).

Les Schistosomes aviaires sont donc responsables de lésions plus ou moins graves chez les oiseaux aquatiques, notamment dans les cas d'infestation massive, ou de co-infestation par plusieurs parasites différents. Ainsi, Wojcinski *et al.* (1987) désignèrent les parasites des genres *Trichobilharzia* et *Dendritobilharzia* comme responsables, à hauteur de 90%, du décés d'une population de 40 *Branta bernicla hrota*. Les lésions retrouvées furent des thromboses des veines mésentériques, des colites fibrinohémorragiques, ainsi que des hépatomégalies. Des encephalites granulomateuses, des lésions hépatiques et pulmonaires ont également été rapportées chez des Cygnes (*C. olor*) infestés par des parasites du genre *Dendritobilharzia.* Ces lésions semblaient à l'origine de la mort des oiseaux (Wilson, 1982). D'autres lésions chez ces hôtes définitifs, telles que des endophlébites, des hyperplasies et oblitérations des vaisseaux hépatiques et mésentériques dues à des Trichobilharzies furent aussi décrites en milieu naturel (van Bolhuis *et al.*, 2004). Les conséquences de la présence chez l'hôte définitif de ces parasites sont donc non négligeables et influent sur leur durée de vie. Les études expérimentales récentes impliquant des espèces nasales, en particulier pour *T. regenti*, appuient cette théorie. La migration du parasite au niveau du système nerveux central, et la réaction inflammatoire qui en découle, peuvent avoir des conséquences graves du fait de la localisation particulière des lésions. Des troubles nerveux et des paralysies peuvent ainsi apparaître (Blažová et Horák, 2005; Horák et Kolářová, 2005 ; Chanová et Horák, 2007).

1.5. Schistosomes aviaires et dermatite cercarienne

1.5.1. Historique

Les premières descriptions sont celles de Naegeli, qui décrivit en 1923 un « *exanthema caniculare* » (éruption caniculaire) chez plusieurs baigneurs du lac de Constance (Suisse), soupçonnant alors le plancton animal d'être responsable de cette maladie cutanée. En 1928, après avoir constaté l'apparition de nombreux cas de dermatite non expliqués au niveau du Lac de Douglas (Michigan) depuis une quinzaine d'années, Cort réussit, de manière accidentelle, à identifier l'agent responsable de ces pathologies : en plongeant sa main dans un bac contenant des mollusques récoltés la veille, il vit apparaître des lésions similaires à celles retrouvées sur les pécheurs et baigneurs du lac. Expérimentalement, il obtint des cercaires identifiées comme correspondant à l'espèce décrite par Miller en 1923 sous le nom de *Cercaria elvae* et en déposa quelques unes sur le bras d'un volontaire. Les lésions apparurent quelques jours plus tard, lui permettant ainsi de mettre en évidence la relation entre les mollusques et les cas de dermatite. La dermatite fut appelée « Sedge pool itch » du nom de la plage où les premiers cas furent décrits. Le mollusque mis en cause alors était une *Lymnaea emarginata-angulata* Sowerby. Durant ses expériences, il observa des symptômes polymorphes chez différents patients testés dans les mêmes conditions, en fonction de la localisation du test, de la qualité de l'eau et du nombre de cercaires utilisées. Par la suite, il identifia une seconde espèce émise par les mollusques, *Cercaria elephantis* Cort, 1917, ne provoquant pas de dermatite chez les sujets testés (Cort, 1928).

La dermatite cercarienne est aujourd'hui une affection cosmopolite qui touche tous les continents à l'exception de l'Antarctique. Suivant les localisations, différents noms lui ont été attribués. Très souvent, un lien existe entre les sites répertoriés comme potentiellement contaminés et le trajet migratoire des grands groupes d'oiseaux aquatiques.

1.5.2. Répartition en France

Le premier cas avéré de dermatite cercarienne en France fut décrit par Brumpt en 1931. Suite à des plaintes concernant des démangeaisons survenues après contact avec les eaux des ruisseaux du Bois de Boulogne, 754 mollusques (*Lymnaea stagnalis* et *Planorbis corneus*) furent prélevés et mis à émettre. Deux parasites furent ainsi identifiés comme étant *Cercaria ocellata* et *Bilharziella polonica*. Aprés infestation expérimentale sur des sujets sains volontaires, seule *C. ocellata* fut identifiée comme étant l'agent responsable des maladies.

En 1944, de nouveaux cas furent recensés en Indre et Loire. L'hôte intermédiaire fut identifié comme étant *Lymnaea auricularia*, mais aucune étude complémentaire ne fut menée concernant la reconnaissance de l'agent retrouvé.

Par la suite, de nombreux sites firent l'objet d'études suite à la déclaration de cas par des personnes atteintes. Ainsi, les bords de Saône, le lac de Guerlédan, le lac de Pugeat, le lac de Grandlieu, le lac Léman, et plusieurs sites de l'Aube, des Pays de Loire (Grésillé, Nozay, Sillé le Guillaume), de Franche-comté (lac Saint-Point, lac de Remoray) et de Haute-Saône (étang de Rioz) furent concernés par l'émergence de cette maladie (Gay, 1997) (Figure 7).

Figure 7 : Recensement des foyers de dermatite cercarienne en France (selon Bayssade-Dufour *et al.*, 2002)

Dans le reste de l'Europe, différents cas documentés furent décrits en Suisse (Naegeli, 1923). Si pour un grand nombre de pays les épisodes ou les foyers sont peu documentés, en revanche la présence des agents potentiels a été recherchée : Allemagne et Autriche (Picher *et al.*, 1974; Allgower et Effelsberg, 1991; Allerberger *et al.*, 1994; Gloër et Meier-Brook, 1998; Loy et Haas, 2001), Angleterre (Cort, 1936; Knight et Worms, 1972; Harding, 1978), Espagne (Simon-Martin et Simon-Vicente, 1999), Hollande (Leenen et de Roda Husman, 2004; Sluiters, 2004; Schets *et al.*, 2008), Norvège (Thune, 1994), République Tchèque (Kolářová *et al.*, 1989, Kolářová *et al.*, 1992, Kolářová *et al.*, 1997; Rudolfová *et al.*, 2002, Rudolfová *et al.*, 2006; Rudolfová *et al.*, 2007; Faltynkova *et al.*, 2007), Danemark (Berg et Reiter, 1960), Islande (Kolářová *et al.*, 1999; Skírnisson et Kolářová, 2002, Skírnisson et Kolářová, 2008), Suède (Thors et Linder, 2001), Finlande (Niewiadomska *et al*., 1997) et Italie (Golo *et al.*, 1998 ; Canestri-Trotti *et al.*, 2001).

1.5.3. Mise en évidence des agents de dermatite cercarienne

Le diagnostic est souvent lié aux signes cliniques et aux données épidémiologiques du patient (lieu et date de baignade, …) (Verbrugge *et al.*, 2004). Les trois principaux critères épidémiologiques et cliniques sont : un contact récent (96h) avec un milieu aquatique naturel, le développement d'une dermatite papuleuse uniquement sur les zones exposées et l'apparition d'un prurit intense 12 à 24 heures après l'exposition (Appleton, 1984).

Le diagnostic différentiel est souvent délicat et concerne principalement les piqûres d'insectes, les lésions herpétiques, l'impétigo, le lichen plan, les tularémies, ainsi que les lésions provoquées par certains zooplanctons et plantes aquatiques (Hoeffler, 1977). De plus, les manifestations cliniques varient selon l'individu et la répétition des expositions.

Une biopsie cutanée permet la détection des schistosomules, mais celle-ci doit être réalisé avant 24 à 72 heures (lyse ou migration du parasite) (Haemmerli, 1953). Des examens biologiques peuvent également révéler une hyperéosinophilie réactionnelle, mais ne peuvent être utilisés comme diagnostic définitif de la maladie. D'un point de vue immunologique, la primo-infestation se caractérise par une libération, par les lymphocytes, de facteurs de type Th1/Th2. En revanche, lors d'une infestation secondaire, la réponse cellulaire sera uniquement de type Th2 avec une augmentation des IgG et des IgE (Kouřilová *et al.*, 2004a). Récemment, des études ont montré que l'exposition à des cercaires de *T. regenti* induisaient la production d'anticorps IgM contre les glycanes structurels des cercaires et leurs produits de secrétion, ainsi qu'une augmentation des IgG1 et IgG2b associés à la réaction Th1/Th2 (primo-infection), et des antigènes spécifiques IgG1 et des anticorps sériques IgE totaux associés à une réponse Th2 unique (expositions répétées) (Lichtenbergová *et al.*, 2008). On observe aussi une modification du bilan inflammatoire (dosage

des IgE totales, IgG, IgM, fraction C3 du complément et proteine C réactive). La réaction inflammatoire conduisant à la destruction du parasite est caractérisée par le regroupement de cellules immunitaires (neutrophiles, éosinophiles, macrophages, lymphocytes CD4+ et mastocytes) avec synthèse d'anticorps. Des médiateurs sont également présents tels que les cytokines IL-1 (α et β), IL-6 et IL-12 (primo-infestation). Lors d'infestations répétées, une réaction d'hypersensibilité semblable aux phénomènes allergiques se produit avec la présence d'IL-4 et d'IL-10 et la libération d'histamine en grande quantité par dégranulation des mastocytes. Cette libération est induite par la présence des cercaires et par le contenu de leurs glandes de pénétration (Lichtenbergová *et al.*, 2008). L'utilisation de techniques telles que la Cercarienhüllenreaktion, les tests de fixation du complément, l'IFAT (indirect immunofluorescence tests) et l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a permis la détection d'anticorps pour *T. szidati*, *T. regenti* et *Schistosoma mansoni*. La présence de réaction antigènes-anticorps étant dépendante du stade parasitaire. Les anticorps du sérum réagissent avec les cercaires libres, mais n'ont aucune action sur les schistosomules (modification de leur paroi). La mise en évidence de ces schistosomules semble possible par l'existence d'antigènes excrétés ou secrétés, notamment les anti-GAA présents dans leur système digestif et retrouvés dans le sang (Kolářová *et al.*, 1994, Kouřilová *et al.*, 2004a). Malheureusement, ces réactions ne sont pas spécifiques d'une espèce et ne permettent donc pas la mise en œuvre d'un diagnostique différentiel. En revanche, la découverte de plusieurs antigènes cercariens (notamment une fraction de 34 kDa) reconnus par les anticorps présents dans le sang de patients possédant un historique de dermatite cercarienne (IgG), pourrait ouvrir la voie à de nouveaux outils diagnostiques dans le futur (Lichtenbergová *et al.*, 2008).

1.6. La dermatite cercarienne : incidence, pathogénie ?

La dermatite cercarienne est une pathologie estivale du fait de son éthologie, pouvant toucher aussi bien les adultes que les enfants et s'exprimant différemment de celles occasionnées par la pénétration des bilharzioses humaines (Cort, 1950). Les lésions sont dues à la libération d'enzymes protéolytiques lors de l'entrée du parasite au niveau cutané (Olivier, 1949, Haemmerli, 1953), mais également par une réaction inflammatoire de l'hôte. La symptomatologie se traduit par une réaction cutanée prurigineuse quelques minutes après l'exposition, maculo-papuleuse, d'intensité et de durée variable en fonction du temps d'exposition, de la zone couverte, de la sensibilité du patient (Cort, 1950). Dans certains cas, des réactions plus importantes ont pu être observées : oedèmes, fièvres, altération de l'état général (Cort, 1950 ; Appleton et Lethbridge, 1979; Berg et Reiter, 1960; Eklu-Natey *et al.*, 1985), et parfois des phénomènes de surinfection dus à l'entrée de germes lors du grattage (Brackett, 1940).

Afin d'étudier les réactions mises en jeu lors de la pénétration du parasite chez un hôte « anormal », des études en conditions expérimentales ont été menées chez différents mammifères (souris, hamster, singe…) (Cort, 1950; Olivier, 1953). La migration chez cet hôte anormal se déroule, pour les premières phases, de façon identique à celle observée chez l'hôte définitif habituel. Dans le cas d'un hôte préalablement immunisé, la cercaire sera prise en charge par le système immunitaire et détruite. Dans le cas contraire, les schistosomules pourront migrer et rejoindre le système sanguin pour se loger au niveau pulmonaire (Haas et Pietsch, 1991; Horák et Kolářová, 2000), sans toutefois poursuivre leur développement en stade adulte. Chez les mammifères, des infestations répétées produisent une diminution du nombre de schistosomules au niveau des poumons, probablement due à la présence d'anticorps, sans toutefois annihiler totalement le parasite (Horák et Kolářová, 2000).

Le premier type de réaction décrit est une hypersensibilité au niveau cutané provoquée par la pénétration des furcocercaires chez les mammifères. Cette réaction cutanée a pour but de détruire les cercaires afin de préserver les organes cibles. Lors d'infestations expérimentales par *T. regenti* sur souris immunodéprimées, aucune réaction cutanée n'est observée (absence de lymphocytes B et T) et un nombre très important de schistosomules est retrouvé au niveau du SNC. En revanche, chez le sujet sain, on constate un réponse d'hypersensibilité de type I immédiate puis une phase plus tardive d'inflammation cutanée. Cette dernière est associée à une réaction de type Th2 polarisée correspondant à une réaction immunitaire acquise (Kouřilová *et al.*, 2004b). Le second type de lésion est du à la migration du parasite au niveau des différents organes. Lors d'une primo-infestation par des furcocercaires de *Trichobilharzia regenti*, une inflammation apparaît au niveau du SNC pouvant entraîner des paralysies (Horák *et al.*, 1998). Les lésions, quelque soit l'hôte, persisteront de 5 à 15 semaines (Gay *et al.*, 1999 ; Bayssade-Dufour *et al.*, 2002).

Des formes ectopiques peuvent également apparaître. Ce sont les formes atteignant les muqueuses superficielles telles que la muqueuse vulvaire. Les lésions sont alors ulcéreuses, ou ulcérovégétantes, aboutissant à des végétations papillomateuses semblables à des végétations vénériennes (Carré, 2005).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Les échantillons

2.1.1. L'avifaune

La récolte des échantillons fut possible grâce aux personnels techniques et aux agents des services de garderie de l'ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage). Pour les espèces protégées, leur récolte correspond à des animaux trouvés morts dans un état de conservation convenable pour envisager une recherche de parasite. Les collectes se sont également appuyées, par le biais du réseau SAGIR et de différents Laboratoires Vétérinaires Départementaux, sur des animaux tués en période de chasse ou lors d'études dans un contexte d'épidémiosurveillance de la grippe aviaire, grâce à la participation de chasseurs.

2.1.1.1. Origine

Les animaux prélevés sur le terrain ont été congelés dès leur mort, avant leur acheminement au laboratoire. Les oiseaux analysés provenaient principalement de différents sites de la région Champagne–Ardenne (lac du Der-Chantecoq et plans d'eau situés à proximité, Montmirail et Vouziers), du lac d'Annecy (Haute Savoie), et d'un plan d'eau à vocation récréative près de Beauvais (Oise). Des animaux en provenance d'Islande ont également été mis à notre disposition par le Professeur Karl Skírnisson.

318 têtes d'oiseaux ont été autopsiées pour la recherche de parasites au niveau nasal, appartenant à 16 espèces : 197 Colverts (*Anas platyrhynchos*), 4 morillons *(Aythya fuligula*), 11 milouins (*Aythya ferina*), 5 Souchets (*Anas clypeata*), 40 Cygnes tuberculés (*Cygnus olor*), 1 Harle bièvre (*Mergus merganser*), 3 Foulques macroules (*Fulica atra*), 9 Cormorans (*Phalacrocorax carbo*), 9 Oies cendrées (*Anser anser*), 3 Pilets (*Anas acuta*), 23 Sarcelles d'hiver (*A. crecca*), 3 canards siffleurs (*A. strepera*), 3 Grues cendrées (*Grus grus*), 2 grèbes huppés (*Podiceps cristatus*), 2 Hérons cendrés (*Ardea cinerea*) et 3 poules d'eau (*Gallinula chloropus*).

82 examens de viscères ont été effectués sur 15 espèces différentes d'oiseaux aquatiques, tous ces oiseaux ayant fait l'objet d'un examen préalable au niveau nasal lorsque celui-ci s'est avéré possible (absence de tête pour quelques Cygnes et Oies, lors de leur mort par électrocution accidentelle): 31 *Anas platyrhynchos*, 1 *Aythya fuligula*, 1 *Aythya ferina*, 4 *Anas clypeata*, 9 *Cygnus olor*, 1 *Fulica atra*, 3 *Phalacrocorax carbo*, 4 *Anser anser*, 2 *Anas acuta*, 15 *Anas crecca*, 2 *Anas strepera*, 3 *Grus grus*, 1 *Podiceps cristatus*, 2 *Ardea cinerea* et 3 *Gallinula chloropus*.

2.1.1.2. Exploration des organes

2.1.1.2.1. Têtes et cavités nasales

Une fois décongelé à température ambiante, le bec est séparé du reste de la tête en découpant ce dernier au dessus des orifices nasaux. Le bec est ensuite perfusé à l'aide d'une seringue contenant de l'eau distillée. Les cornets nasaux sont retirés du reste du crâne après avoir soigneusement ouvert la tête. Ils sont dilacérés dans une boite de Pétri contenant de l'eau distillée afin d'isoler d'éventuels oeufs ou adultes (le plus souvent des fragments) présents au niveau de la muqueuse. Le liquide de perfusion et de lavage des cornets est centrifugé à 2500 trs/min pendant 2 min, puis le culot est observé sous la loupe binoculaire ou au microscope, entre lame et lamelle, pour la recherche d'autres œufs ou miracidiums.

Les éléments parasitaires (œufs, fragments de vers adultes) retrouvés sont ensuite isolés, lavés dans un bain d'alcool à 70° puis placés dans un tube Eppendorf 1.5 ml contenant soit de l'alcool à 95° en vue d'une analyse en biologie moléculaire, soit du formol 10% pour leur conservation en vue d'une analyse morphométrique ultérieure.

2.1.1.2.2. Viscères

Après décongélation, le corps est ouvert sur sa partie ventrale à l'aide d'un scalpel, en faisant attention de ne pas endommager les organes. Le sternum et les côtes sont coupés puis écartés afin de permettre l'accès aux poumons, cœur et trachée. Après ligature (au niveau du cloaque et du gésier), l'intestin est sorti de la cavité abdominale, isolé, puis déroulé pour faciliter l'isolement du réseau mésentérique. Les caecums sont ensuite séparés du reste de l'intestin. Le contenu intestinal est récupéré sur un filtre de maille 160 µm, puis placé dans un récipient. La paroi de l'intestin est ouverte sur la longueur à l'aide d'une sonde cannelée et la muqueuse raclée ; le tout est conservé dans un récipient contenant du liquide physiologique. On procède de la même façon avec les caecums et leur contenu. Le foie, le gésier et le ventricule succenturié sont isolés et conservés séparément.

L'ensemble du contenu intestinal et caecal, mais aussi des autres compartiments du tube digestif (gésier et ventricule succenturié), après filtration, est observé afin d'isoler l'ensemble des parasites en prévision d'autres travaux. Dans un récipient contenant de l'eau distillée, la paroi de l'intestin (et des caecums) est soumise, après dilacération, à une agitation manuelle; le contenu du flacon est laissé à sédimentation environ 30 minutes avant sa lecture sous la loupe afin de

rechercher d'éventuels œufs et vers présents dans la paroi (Karl Skírnisson, communication personnelle).

Le foie est dilacéré afin de découvrir, dans la mesure du possible, les vaisseaux hépatiques. Le tout est soumis à une agitation manuelle dans un flacon contenant de l'eau distillée. Après sédimentation, la lecture se fait sous la loupe dans un faible volume (forte densité). Il est à noter que la nature des échantillons (viscères congelés) rend souvent difficile l'observation.

Tous les parasites (œufs, adultes, larves…) isolés sont conservés prioritairement en alcool plutôt que dans une solution formolée (formol du commerce au 1/10ième).

2.1.2. Les mollusques

Le ramassage des mollusques a été effectué sur les plages et sur les bords (eaux peu profondes) des sites étudiés. Les mollusques ont été ramassés soit à la main, soit triés sur tamis après faucardage. Durant l'étude, 5742 mollusques ont été prélevés sur 4 sites : le lac d'Annecy, le lac du Der-Chantecoq, le plan d'eau du Canada (Beauvais) et sur un site de baignade de la communauté urbaine de Strasbourg. 3458 mollusques appartenaient au genre *Radix*, 612 au genre *Lymnaea*, 955 au genre *Bithynia*, 100 au genre *Stagnicola*, 329 et 288 à des représentants respectifs de la famille des Planorbidae et des Physidae.

2.1.2.1. Sites de prélèvements

2.1.2.1.1. Lac du Der-Chantecoq

Situé dans le région Champagne Ardenne entre les départements de la Marne (51) et de la Haute-Marne (52), ses coordonnées géographiques sont latitude 48°35'N et longitude 4°46'E en son centre. Ce lac artificiel appartient à l'Institut Inter départemental des Barrages et Réservoirs du Bassin de la Seine (IIBRBS) et fut mis en service en 1974. Il permet de renforcer le débit des rivières en étiage et d'atténuer l'ampleur des crues, principalement pour les eaux de la Marne et de la Seine. Sa profondeur moyenne est 7,30 m avec un maximum de 16,5 m. Avec 4800 ha d'eau et 77 km de rives, il s'agit d'un des plus grands plans d'eau artificiels d'Europe. Le lac du Der est une réserve importante pour les oiseaux migrateurs. 270 espèces ont ainsi été recensées sur le site. Il est également classé réserve nationale de chasse et de faune sauvage depuis 1978. C'est aussi un important site d'exploitation touristique, possédant des infrastructures permettant l'accueil des baigneurs et plaisanciers. Une étude menée en 2005, suite à des suspicions de cas de dermatite, a permis de mettre en évidence la présence de deux espèces de Schistosomes aviaires (*T. franki* et *T.*

szidati) émis respectivement par *R. auricularia* et *L. stagnalis* (Ferté *et al.*, 2005). Le lac est un site intéressant d'étude des parasites aviaires car c'est un point de rencontre entre l'homme et tous les agents qui composent le cycle de la dermatite.

2.1.2.1.2. Lac d'Annecy

Lac de montagne né du réchauffement qui a suivi le Würm (glaciation de l'ère quaternaire). D'une surface de 27 km2, le lac s'étend sur 14.6 km pour une largeur de 3.2 km. La profondeur moyenne est de 41m. Ses coordonnées géographiques sont latitude 45°51'N et longitude 6°10'E en son centre. Le littoral est formé d'une pente douce s'accentuant ensuite rapidement. La faune du lac d'Annecy est composée de nombreuses espèces d'oiseaux nicheurs, mais aussi d'oiseaux hivernant (Moinet-Felder, 2002). Le lac d'Annecy fut longtemps considéré comme le principal foyer de dermatite cercarienne en France, avec un impact important sur le tourisme et l'économie.

Différentes études épidémiologiques ont donc été réalisées à la fin des années 1990, afin de mettre en œuvre des moyens de prévention adaptés (Caumes *et al.*, 2003; Léger et Martin-Loehr, 1999). Aujourd'hui encore, par l'affluence touristique qu'il génère, ce site est un lieu d'étude épidémiologique privilégié en France pour les Schistosomes aviaires.

2.1.2.1.3. Sites de Beauvais et de Strasbourg

Suite à des cas de dermatite récemment déclarés, une enquête épidémiologique a été menée, sur demande des gestionnaires responsables de ces sites, afin de mettre en évidence la présence de parasites et ainsi déterminer les différents agents responsables.

2.1.2.2. Mollusques : pré-identification

Elle s'appuie sur des caractères morphologiques externes d'observation simple ne portant pas à confusion : ouverture de la coquille, présence ou non d'un opercule, aspect de l'enroulement,… (Figure 8).

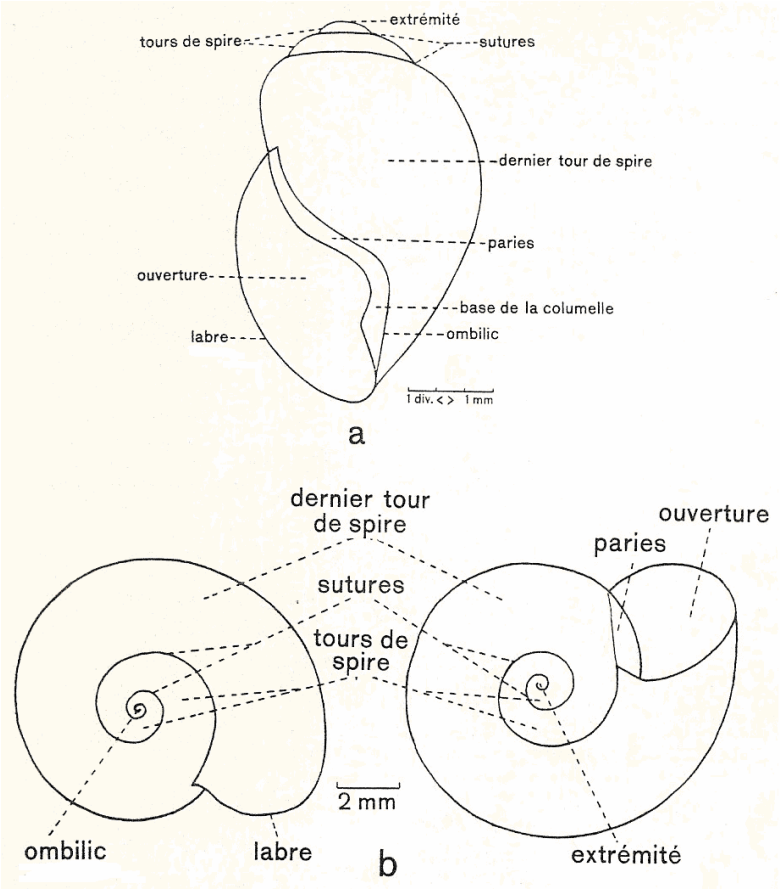


Figure 8 : Eléments de morphologie externe (Coquille) utilisés pour la classification des mollusques (d'après Fraga De Azevedo, 1959)

Puis, à l'aide de ces différents caractères, nous avons adopté une démarche de tri selon la clé d'identification proposée ci –dessous.

Clé d'identification des mollusques (d'après Rudolfová, communication personnelle) :

A. Mollusques à ouverture senestre…….…..……..…..**PHYSIDAE**
   Mollusques à ouverture dextre……...……..B
B. Mollusques possédant un opercule…….……..……...…. ***Bithynia* sp.**
   Mollusques ne possédant pas d'opercule…….……C
C. Mollusques à tours de spires plans……**PLANORBIDAE**
   Mollusques à tours de spires non plans……...……..……....**LYMNAEIDAE**(D)
D. Mollusques dont la hauteur de l'ouverture est inf à la moitié de la taille……...***Stagnicola* sp.**
   Mollusques dont la hauteur de l'ouverture est sup ou égale à la moitié de la taille……E
E. Mollusques dont la hauteur de l'ouverture est égale à la moitié de la taille…....***Lymnaea* sp.**
   Mollusques dont la hauteur de l'ouverture est sup aux 2/3 de la taille….....…..***Radix* sp.**

2.1.2.3. Tests d'émission

Ils ont pour but de provoquer artificiellement, au laboratoire, la libération des cercaires par les mollusques sous l'influence de la lumière et de la chaleur.

Les mollusques sont répartis par groupes de 5 ou 10 exemplaires du même genre dans des bacs en verre contenant de l'eau minérale.

Les bacs sont placés sous des lampes durant 30 minutes à une heure, puis observés sous la loupe binoculaire. En cas d'émission de cercaires, chaque mollusque du bac est rincé et soumis individuellement à un second test d'émission. Pour les mollusques négatifs, l'opération est renouvelée en début et fin de journée pendant environ 4 à 5 jours. Entre chaque journée de test, les mollusques sont conservés en eau de source à 4°C.

2.1.3. Conservation

Les cercaires sont ensuite prélevées et conservées dans des microtubes contenant soit de l'alcool à 96° (pour l'approche moléculaire) en utilisant un matériel stérile afin d'éviter tout risque de contamination, soit dans une solution de formol à 10%, la conservation en formol étant destinée aux mesures morphométriques.

Quant au mollusque émetteur, il est à nouveau rincé et une petite partie du pied est prélevée pour être conservée dans un microtube contenant de l'alcool à 96° afin d'envisager une approche moléculaire en vue d'une identification selon Bargues *et al.*, 2001. Le reste du corps est stocké à –20°C dans un sachet plastique. Afin d'obtenir une traçabilité efficace de nos échantillons, nous avons opté pour un code à double entrée faisant référence à la fois au mollusque émetteur et au type de cercaire émise par ce mollusque, code proposé par Ferté *et al.*, 2005 et affiché lors du dépôt des séquences dans GenBank.

2.2. Approches morphologiques

2.2.1. Vers adultes : coloration et montage

La coloration des parasites adultes est faite à l'aide de carmin chlorhydrique et d'hématoxyline, colorants habituellement adaptés à la coloration des cestodes et des Trématodes. Les parasites sont placés dans de petits bacs de coloration appelés aussi « salières » dans lesquels s'effectueront les différents bains à partir du matériel conservé en alcool à 70° :

- mise au contact du carmin chlorhydrique : 12 à 18H (une nuit)
- lavage à l'alcool chlorhydrique pour enlever l'excès de colorant (contrôle sous la loupe binoculaire)
- rinçage et arrêt de la décoloration avec de l'alcool à 70°

- succession de bains de 5 à 10 mn dans des alcools de degré croissant (90°, 95°, absolu) pour déshydrater le matériel
- passage dans de la créosote de hêtre afin de parfaire le contraste
- montage entre lame et lamelle dans du baume du Canada faisant office de résine.

En fonction de la taille des vers adultes (*Bilharziella* et *Dendritobilharzia* ou *Trichobilharzia*), le temps de décoloration par l'alcool chlorhydrique et le passage dans la créosote sont plus au moins longs. Les montages obtenus sont définitifs et permettent la conservation du parasite dans le temps (lames de référence).

2.2.2. Œufs : mensurations

Les œufs sont isolés puis étudiés selon différents critères : selon leur forme (en croissant ou ovoïde, symétrique ou asymétrique), leur taille (longueur, largeur), la présence ou non d'une pointe terminée par un petit crochet et la présence ou l'absence d'un miracidium. Les mesures ont été effectuées sur des œufs mis dans l'eau (après décongélation des oiseaux) ou après fixation dans une solution formolée (solution du commerce diluée au 1/10ième).

2.2.3. Cercaires : pré-identification

L'identification spécifique des cercaires sensu lato, en particulier celle des furcocercaires, a été proposée par Combes *et al.*, 1976 et Combes *et al.*, 1980. Si cette approche morphologique est rendue possible après imprégnation argentique, la mise en œuvre est relativement délicate pour différencier les furcocercaires à ocelles pigmentés. Aussi, nous avons délibérément opté pour une clé de détermination simplifiée avant d'envisager une identification moléculaire (Figure 9).

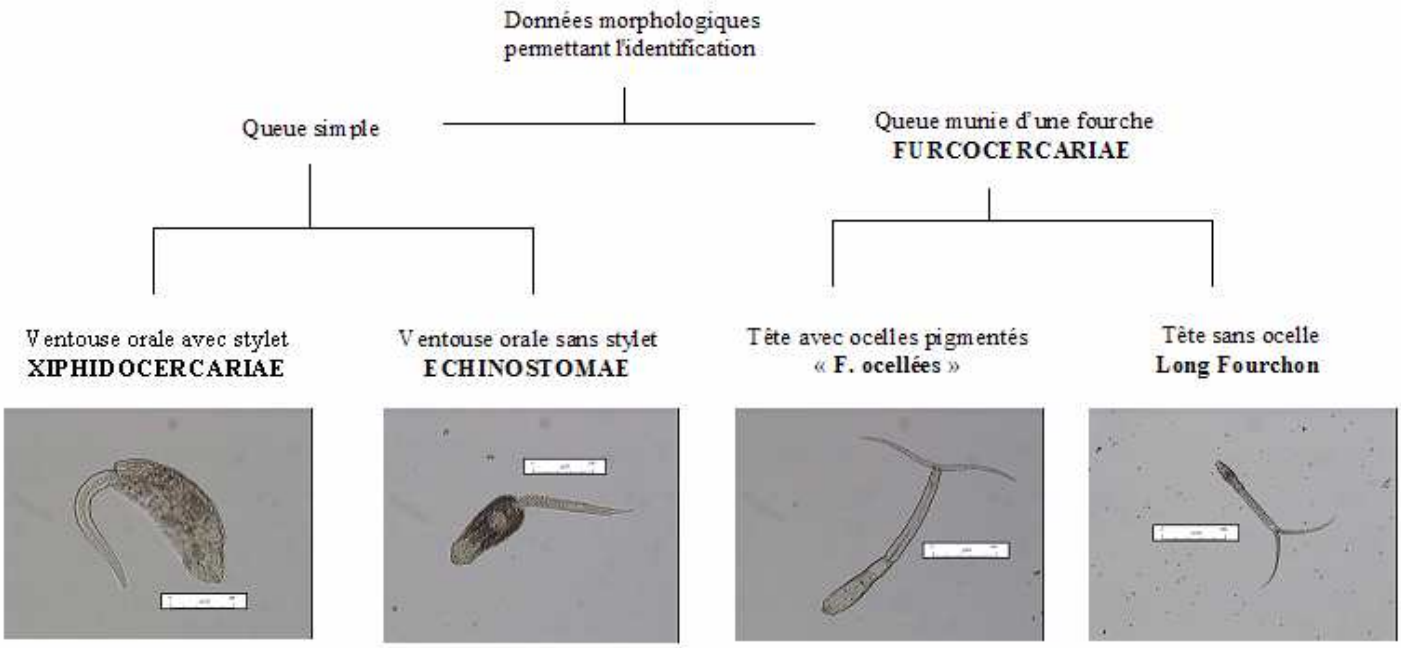


Figure 9 : Clé d'identification des principales cercaires retrouvées chez les mollusques

2.3. Approches moléculaires

2.3.1. ADN ribosomique nucléaire et ADN mitochondrial

Chez les eucaryotes, l'ADN ribosomique est un gène nucléaire présentant un nombre de copies très élevé (plusieurs milliers). Celles-ci se structurent selon une disposition en tandem et en série. Chaque unité dupliquée est composée des gènes codant pour la petite sous unité 18S (small subunit ; SSU) et la grande sous unité 28S (large subunit ; LSU), ces deux unités étant elles-mêmes séparées par un petit gène 5,8S. Au centre de cette unité, encadrant le gène 5.8S, sont présents deux domaines transcrits internes (First and Second Internal Transcribed Spacer : ITS-1 et ITS-2). Ces ensembles sont encadrés par de grands espaceurs intergéniques (IGS), extragéniques (EGS) et non transcrits (NTS). Au sein même de ces espaceurs, on trouve de petites zones de transcription appelées espaceurs transcrits externes (ETS), généralement situées aux extrémités des gènes 18S et 28S. Quant aux espaces non transcrits, ils jouent le rôle de régulateurs lors de la transcription (Figure 10).

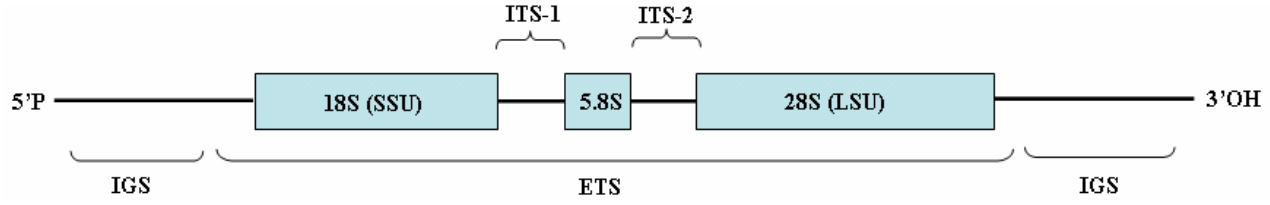


Figure 10 : Structure générale d'une unité de l'ADNr

Dans la structure de l'ADNr 28S, on retrouve une alternance de zones conservées utilisées notamment lors des alignements et de zones variables appelées domaines divergents (Figure 11). Ce sont ces domaines variables qui permettent d'établir des parentés phylogénétiques. En effet, ces domaines, au nombre de douze et numérotés D_1 à D_{12} à partir de l'extrémité 5'P, diffèrent par leurs longueurs et leurs degrés de variabilité. Les plus divergents discriminent des espèces proches tandis que les plus conservés permettent l'étude et la comparaison d'espèces éloignées les unes des autres.

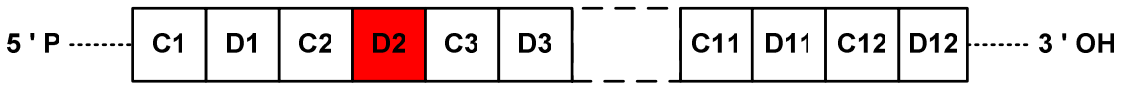


Figure 11 : Structure de l'ADNr 28S (C= région conservée ; D= région divergente)

Les séquences d'ADNr sont également soumises à un processus nommé « évolution concertée » ; lorsqu'une mutation apparaît au niveau nucléotidique d'une copie de la séquence mère, celle-ci est automatiquement corrigée afin de correspondre aux autres copies. Toutefois, lors de ces changements, la séquence mutée peut elle-même devenir « séquence modèle » pour toutes les autres copies, permettant ainsi la propagation de cette mutation. Ces mutations jouent un rôle dans les différenciations interspécifiques. Des variations intraspécifiques ou populationnelles peuvent toutefois survenir car cette « évolution concertée » est un processus plus lent que le taux de mutation lui-même.

Enfin, une zone distincte de l'ADNr code pour un ARN 5S ; le rôle de celui-ci est actuellement mal défini.

Le génome de l'ADN mitochondrial a été séquencé pour quelques espèces de Trématodes : dans le groupe des Plathelminthes, 5 espèces de la Classe des Cestoda : *Taenia solium* et *asiatica, Echinococcus multilocularis* et *granulosus, Hymenolepis diminuta* et 9 espèces de la Classe des Digenea : *Fasciola hepatica, Paragonimus westermani, Schistosoma japonicum, S. mansoni, S. mekongi, S. malayensis, S. haematobium, S. spindale* (Le *et al.*, 2001; Littlewood *et al.*, 2006). Actuellement, pour les différents Schistosomes aviaires, seul le génome complet de *Trichobilharzia regenti* a été étudié (Webster *et al.*, 2007). Le gène *Cox1* a également fait récemment l'objet de nombreuses études, tel que le BarCoding, pour son rôle dans l'identification d'espèces (Hebert *et al.*, 2003). Pfenninger, en 2006, proposa une classification des mollusques du genre *Radix* en différents MOTU (Molecular Operate Taxon Units) à partir de ce gène, mais sans définir de noms d'espèces pour chacun de ces groupes.

2.3.2. Choix des domaines étudiés

Le choix des amorces est fait en fonction de la nature du domaine étudié, et plus particulièrement de son caractère conservé ou non.

2.3.2.1. Parasites : domaines D2 et ITS (ADNr)

L'avènement de la biologie moléculaire a permis l'apport de nouveaux outils pour l'identification et la caractérisation des parasites (McManus et Bowles, 1996), ainsi que les recherches en phylogénie et systématique (Hwang et Kim, 1999).

Des études portant sur l'ADN ribosomique et l'ADN mitochondrial ont ainsi été menées sur les Trématodes, notamment sur les espèces impliquées dans les parasitoses humaines : les Schistosomes humains (Le *et al.*, 2000 ; Le *et al.*, 2001) et les agents de Fascioloses (Zurita *et al.*, 1988 ; Itagaki *et al.*, 2005) ; mais aussi sur l'utilisation des petites et grandes sous-unités de l'ADNr chez les Digènes (Littlewood et Johnston, 1995 ; Mollaret *et al.*, 1997 ; Olson *et al.*, 2003 ; Snyder, 2004). Notre choix s'est donc porté sur le domaine D2 de l'ADN ribosomique 28S (ADNr 28S) couramment utilisé au laboratoire pour les Trématodes. Il s'agit d'un domaine relativement conservé, facilement séquençable, et possédant une informativité de niveau spécifique chez les Trématodes. Pour l'amplification des cercaires, des adultes et des oeufs, nous avons donc utilisé les amorces C2'B : 5'-GAA AAG TAC TTT GRA RAG AGA-3' et D2: 5'-TCC GTG TTT CAA GAC GGG-3', complémentaires de la région conservée D2 du gène, telles qu'elles ont été décrites par Mollaret *et al.*, 1997.

Par la suite, de nouvelles études ont été menées sur l'analyse des espaces transcrits internes de l'ADNr (Picard et Jousson, 2001; Dvořák *et al.*, 2002 ; Ferté *et al.*, 2005 ; Rudolfová *et al.*, 2002 ; Brant *et al.*, 2006 ; Rudolfová *et al.*, 2007). Afin de comparer nos résultats obtenus pour le domaine D2, et pour avoir accès aux différentes séquences disponibles pour ces domaines, nous avons donc amplifié nos différents échantillons (espaces transcrits internes ITS-1 et ITS-2) à l'aide des différents couples d'amorces dessinées par Dvořák *et al.* en 2002, complémentaires des régions ITS-1 (ITS2trem : 5'-GCT GCA CTC TTC ATC GAC GC-3', ITS5trem : 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'), ITS-2 (ITS3trem : 5'-GCG TCG ATG AAG AGT GCA GC- 3', ITS4trem : 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), ainsi que de l'ensemble ITS-1-5,8S-ITS-2. Toutefois, l'utilisation de ces espaces transcrits internes s'avère souvent délicate (en séquençage et alignement), par la présence de nombreux domaines répétés, et par la grande variabilité de l'espace transcrit interne 1.

2.3.2.2. Mollusques : domaine ITS-2 (ADNr)

Les difficultés rencontrées en analyse morphologique associées à l'avènement de la biologie moléculaire ont conduit à une identification des mollusques par l'utilisation de domaines génétiques discriminants aux niveaux générique et spécifique. Concernant les Trématodes et leurs hôtes intermédiaires, de nombreuses études ont ainsi été menées sur les mollusques hôtes de Schistosomes humains. En 2001, Bargues *et al.* ont étudié les mollusques appartenant à la famille des Lymnaeidae en Europe par analyse du domaine ITS-2 de l'ADN ribosomal nucléaire. La longueur du domaine ITS-2 varie pour ces espèces de 370 à 491 paires de bases. Les analyses phylogénétiques effectuées à partir des résultats obtenus ont démontré le caractère spécifique de ce domaine pour la discrimination des mollusques, notamment pour ceux appartenant au genre *Radix* pour lesquels l'analyse morphologique au niveau spécifique a du être abandonnée (variations importantes liées à l'environnement, faible quantité d'éléments caractéristiques).

Les amorces utilisées sont des amorces universelles: C1a : 5'-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC T- 3' et ITS3 : 5'-GTC GAT GAA GAA CGC AGC- 3' permettant l'amplification de cette zone de l'ADN ribosomique.

Toutefois, l'utilisation de ces primers universels s'est avérée délicate dans le cas de l'analyse de mollusques infestés. En effet, le prélèvement d'un fragment au niveau du pied pour les mollusques du genre *Radix* est rendue difficile par la petite taille de ces derniers, n'excluant pas le prélèvement simultané d'ADN appartenant au parasite. Dès lors, les résultats du séquençage peuvent être biaisés par la présence simultanée de ces deux ADN. Afin d'éviter ces risques de contamination moléculaire, nous avons donc établi des sondes spécifiques de ces mollusques à partir des sondes pré-éxistantes : Sondes DIX1 : 5'-CGC GCT CTG GWC CKT CGC GGC- 3' et DIX2 : 5'-ATY TYG TYC GAT TTG AGG TTG- 3'.

2.3.3. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

2.3.3.1. Généralités

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode mise au point en 1985 par Kary Mullis et permettant d'obtenir, par couplage à une ADN polymérase thermorésistante et sans clonage, l'amplification d'un fragment connu d'ADN. Initialement, l'ADN polymérase fut isolé à partir d'une bactérie thermophile (résistante aux augmentations importantes de température), telle que *Thermus aquaticus* (*Taq* Polymérase). Actuellement, on utilise des enzymes recombinantes, dont l'élaboration est plus simple et l'efficacité plus grande.

Le principe général de la PCR est l'amplification *in vitro* d'une région spécifique d'un acide nucléique. Par une série de réactions de réplication répétées en boucle, la matrice d'ADN double-brin subit une amplification exponentielle, les produits obtenus pour chacun des cycles servant de matrice aux cycles suivants. La réplication comporte trois étapes : (1) la dénaturation de l'ADN double brin en matrice simple brin ; (2) l'hybridation d'oligonucléotides (amorces spécifiques) permettant de borner et d'amorcer la réplication de la séquence amplifiée ; (3) la réaction de polymérisation du brin complémentaire (synthèse d'ADN par action de la *Taq* Polymérase). Ces trois étapes, réunies en cycles, sont effectuées à des températures correspondant à une activité enzymatique précise, par utilisation d'un Thermocycleur. Le nombre de cycle (environ 30 à 40) permet en théorie une réaction d'amplification selon un facteur 2^{30}. En condition expérimentale, la polymérisation évolue de manière plus variable et ce facteur d'amplification se situe plus couramment entre 10^5 et 10^6. La réaction de PCR est réalisée dans des conditions rendues optimales par l'addition d'un tampon. Ce tampon est composé de Tris Hcl à pH basique 8,5-9, de cations bivalents Mg^{2+} servant de cofacteurs de polymérisation, de cations monovalents K^+ ou NH_4^+ neutralisant les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN (stabilisation). Le milieu réactionnel est également composé d'un large excès d'oligonucléotides amorces, ainsi que de désoxyribonucléotides (dNTP) libres. Le choix des amorces est crucial, permettant l'hybridation à l'ADN matrice et la délimitation de la région d'ADN à amplifier. Elles serviront également d'amorces à la *Taq* Polymérase grâce à leur extrémité 3'OH libre. Par des logiciels d'analyse de séquences, les amorces sont donc « dessinées » afin qu'elles puissent s'hybrider aux extrémités des régions d'ADN à amplifier. Pour se faire, les deux amorces doivent posséder des Tm (Température de demi-dénaturation) comparables, des séquences non complémentaires entre elles et ne doivent pas contenir de séquences répétées inversées (risque de repliement). Les deux oligonucléotides, contenant en général une vingtaine de bases, sont ensuite synthétisées chimiquement. Ils possèdent une extrémité 5'OH déphosphorylée.

La température est un facteur très important dans la mise au point du protocole PCR, permettant un contrôle de l'activité enzymatique. L'étape de dénaturation (dissociation des deux brins d'ADN) est réalisée à une température de 94°C. Les températures d'hybridation varient (45-60°C) suivant les couples d'amorces utilisés et déterminent la stabilité des hybrides appariés. Le calcul de ces températures se fait en ôtant environ 5°C au Tm de l'amorce. Ce Tm est calculé selon la formule suivante $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$ où A, T, G et C correspondent respectivement aux quantités de bases présentes dans l'oligonucléotide. Toutefois, cette formule est une estimation, et un test réalisé suivant une gamme de température reste indispensable afin de déterminer les conditions optimales d'hybridation. Enfin, la polymérisation est réalisée à 68 ou 72°C suivant l'ADN polymérase thermorésistante utilisée (recommandations du fabricant).

2.3.3.2. Extraction de l'ADN

L'ADN étudié a été extrait selon le protocole d'extraction pour tissus, et les produits commercialisés dans le QIAMP® DNA Mini Kit (Laboratoire QIAGEN, Hilden, Allemagne) basée sur un principe de purification sur colonne. Une étape préliminaire de broyage par piston stérile (Treff, Degersheim, Suisse) a été ajoutée afin de faciliter la lyse du matériel. S'en suit une phase de lyse à 56°C pendant 1 à 3 heures par introduction d'une protéinase K, puis à 70°C pendant 10 minutes. Après passage sur colonne (QIAMP Mini Column), l'ADN est adsorbé sur une résine puis soumis à deux rinçages successifs suivies d'une centrifugation afin de récolter et d'éliminer les impuretés, avant d'être élué dans un volume variable (100 à 200µL suivant la concentration en ADN de départ). Le filtrat obtenu est rendu relativement stable par le tampon d'élution et peut ainsi être conservé à -20°C.

2.3.3.3. Amplification de l'ADN

L'amplification a été réalisée dans un volume de 50µL composé de 5 µL d'ADN et 50 pmol de chacune des sondes. Le Mix contenait, en concentrations finales, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01 % Triton X 100, 200 µM de dNTP pour chacune des bases, et 1.25 unités de *Taq* polymerase (Eppendorf, Germany).

Les espaces transcrits internes (ITS) des parasites ont été amplifiés en utilisant les sondes ITS-2trem, ITS-3trem, ITS-4trem et ITS-5trem décrites précédemment. Le domaine D2 a été amplifié en utilisant les sondes C2'B et D2. La PCR fut réalisée avec une phase de dénaturation initiale de 3 min à 94°C, suivie par 40 cycles comprenant une dénaturation de 45s à 94°C, une hybridation à 50°C pendant 45 sec et une extension pendant 2 min à 68°C, et enfin, une élongation finale de 10 min à 68°C.

Pour les mollusques, l'espace transcrit interne ITS-2 a été amplifié avec les couples de sondes C1A/ITS3 ou DIX1/DIX2. Les conditions d'amplification sont semblables à l'exception du nombre de cycles (35) et de la température d'hybridation (57°C).

2.3.3.4. Révélation sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique permettant la séparation des fragments d'ADN amplifiés en fonction de leur taille. L'électrophorèse se fait en milieu basique, composé

d’un tampon TBE 1X (0,89M Tris ; 0,8M Acide Borique ; 0,02 mM EDTA ; Dissodique pH 8,4). Les acides nucléiques, macromolécules polyanioniques uniformément chargées négativement, une fois placées dans un champ électrique constant, vont alors migrer à travers le gel en direction de l’anode. La vitesse de déplacement des fragments au travers des mailles du gel va donc varier en fonction de la concentration en agarose du gel, mais aussi de la masse moléculaire (nombre de paires de bases) de chacun des fragments. Les gels d’agarose permettent une séparation de fragments dont la taille est comprise entre 0,5 et 20 Kb. A dix microlitres d'amplifiat sont ajoutés 5 microlitres de tampon de charge (0,25% bleu bromophénol, 30% glycérol, 40% sucrose); le mélange est ensuite déposé dans des puits. Un témoin négatif est traité dans les mêmes conditions que les différents échantillons: les 5 microlitres d'extraits sont alors remplacés par 5 microlitres d'eau purifiée, afin de contrôler l'absence de contamination.

Dans le gel sont également introduits quelques microlitres de BET (Bromure d'éthidium); il s'agit d'un agent s’intercalant au niveau des paires de bases de l’ADN et émettant une fluorescence orange sous ultraviolet (UV) à 200-300nm. Le seuil de détection de l’ADN par cette technique se situe à quelques ng seulement.

Pour chaque gel est également déposé un marqueur de poids moléculaire (100bp DNA Lader GIBCO) afin d'étalonner la taille des fragments amplifiés.

2.3.3.5. Séquençage

Après révélation et vérification des bandes recherchées, les 45 microlitres d'amplifiât restant sont déposés sur "Grand gel". Les bandes d’intérêts obtenues sont révélées puis découpées sous U.V et envoyées à la société QIAGEN (Hilden, Allemagne) qui réalise la purification et le séquençage; les produits de PCR obtenus durant l’étude ont été séquencés directement dans les deux sens avec les sondes utilisées lors de l’amplification de l’ADN. L e séquençage peut alors s’effectuer soit directement à partir du produit amplifié par PCR (séquençage direct), soit par clonage nécessitant le recourt à des plasmides ou phages. Plus rapide et permettant l’obtention d’une seule séquence correspondant à la souche majoritaire, le séquençage direct fournit également une grande résolution relative aux variations nucléotidiques (seuil de polymorphisme d’un seul nucléotide). Toutefois, cette technique est coûteuse et rendue parfois difficile par l’analyse de séquences nucléotidiques de grande taille (supérieure à 1 Kb).

2.3.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

L'ADN amplifié est mis en présence d'une (ou plusieurs) enzyme de restriction. Celles-ci vont digérer (couper) le brin d'ADN en différents sites spécifiques de cette enzyme (sites de restriction). Les variations de taille et de nombre entre les différents fragments de la molécule d'ADN seront détectées après séparation sur gel d'électrophorèse. Afin d'augmenter la quantité d'ADN présent dans le milieu, une amplification par PCR peut être effectuée au préalable. Celle-ci permet une meilleure visualisation du polymorphisme des bandes obtenues.

L'ADN extrait et amplifié de nos mollusques a donc été soumis à une digestion enzymatique. La digestion est réalisée dans un volume total de 20µL comprenant 10 µL de produit de PCR, 20µL de tampon Buffer10X fourni par le fabricant, 2µL d'enzyme et 6 µL d'eau ultrapure. Une fois mélangés, le tout est placé en incubation à 70°C durant 4 heures dans un bain-marie à sec. La révélation est réalisée sur gel d'agarose 1.5%. L'enzyme que nous avons sélectionnée est l'enzyme *Taq*1. En effet, celle-ci va cliver un site spécifique de l'ADNr au niveau de l'espace transcrit interne ITS-2 des mollusques (formation de 2 brins nucléotidiques), uniquement pour ceux appartenant à l'espèce *R. peregra / ovata*.

2.4. Analyses phylogénétiques

La Phylogénie correspond à l'histoire évolutive des êtres vivants, avec pour but la reconstruction des liens de parenté entre les organismes en estimant leurs délais de divergence. Ce concept fut introduit par Haeckel en 1866. L'entomologiste allemand Hennig (1913-1976) est le créateur du concept de systématique phylogénétique (cladistique). Un groupe monophylétique (ou clade) est défini comme regroupant un ancêtre et tous ses descendants, par opposition aux groupes paraphylétiques (regroupant un ancêtre et une partie de ses descendants) et aux groupes polyphylétiques (regroupement artificiel d'une partie des taxons descendants de plusieurs ancêtres). Selon un concept de descendance, une différence sera faîte, pour une modification de caractère donné au sein d'un groupe, entre l'état ancestral (plésiomorphe) et l'état dérivé (apomorphe) de ce caractère. La phylogénie est ainsi basée sur le précepte néo-Darwinien, selon lequel l'évolution résulte de mutations et de sélections : de nouveaux caractères apparus au hasard des mutations dans un organisme se retrouvent dans un nombre de plus en plus grand d'individus lorsqu'ils favorisent la survie et la reproduction de ceux-ci. Ayant plus de descendants, les individus les mieux adaptés transmettent davantage les gènes codant leurs adaptations favorables.

Seule la synapomorphie (partage d'un état dérivé pour plusieurs espèces) permet de rassembler les individus dans un groupe monophylétique. Une symplésiomorphie (partage de l'état

ancestral) ne permet jamais le regroupement de taxons. Les caractères étudiés doivent être homologues, c'est-à-dire hérités d'un ancêtre commun, l'homologie s'opposant à l'homoplasie qui différencie la convergence (état dérivé dû au hasard) de la réversion (retour d'un caractère vers l'état plésiomorphe).

Le principe de Parcimonie vise à compter le nombre de transformations d'états de caractères (pas) sur chaque arbre (dont le nombre est exponentiel au nombre de taxons) et à retenir celui qui en compte le plus petit nombre.

En 1965, Zuckerkandl et Pauling décidèrent d'appliquer les principes de systématique phylogénétique aux caractères moléculaires. L'évolution rapide des techniques de biologie moléculaire depuis 1980 a ainsi rendu plus aisée l'utilisation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) pour les études phylogéniques. Il est, en outre, le support de l'information génétique transmise et permet l'évolution et la fixation des caractères phénotypiques.

La position de chaque résidu (nucléotide) est alors définie comme un caractère, et le type de résidu (base azotée) est un état de ce caractère. Dans l'ADN, quatre états de caractères existent correspondant aux deux types de bases puriques (Adénine et Guanine) et aux deux types de bases pyrimidiques (Thymine et Cytosine). Les échanges entre deux bases puriques sont appelés Transition (Ti), et ceux entre deux bases azotées de type différent Transversion (Tv). Après alignement de deux séquences, c'est-à-dire en positionnant en correspondance un maximum de résidus identiques, il est ainsi possible de déterminer le degrés d'homologie existant entre ces deux séquences. Toutefois cette étape reste délicate par la présence d'insertions ou de délétions pouvant donner lieu à différents alignements possibles.

Afin d'obtenir le maximum d'informations nécessaires à la construction de modèles phylogéniques, il est important de comparer les résultats obtenus pour différents domaines ou gènes. Ceux-ci doivent évoluer à une vitesse adéquate afin de répondre au mieux à la problématique recherchée : notion d'espèce, de population… Le choix de ces différents domaines est donc primordial.

2.4.1. Alignement

L'alignement des séquences est effectué en disposant, à l'aide d'un logiciel adapté, les parties (ou domaines) étudiées les unes au-dessus des autres en minimisant leurs différences. Les sites possédant le même état pour chaque haplotype sont appelés sites conservés, ceux possédant un changement d'état sont des substitutions. L'alignement est une étape essentielle et parfois complexe par la présence de délétions, et de cet alignement dépend toute l'analyse phylogénétique. Il est donc

essentiel de ne pas négliger un affinage manuel et un retrait des régions où l'alignement est « ambigu ».

La reconstruction phylogénétique se base sur deux méthodologies : la méthode de distances pour laquelle les séquences vont être inclues dans une matrice de distance avant la construction de l'arbre phylogénétique, et la méthode de caractères pour laquelle l'arbre sera construit directement à partir de l'analyse des séquences. Cette dernière méthode comprend les analyses en maximum de Parcimonie, maximum de Vraisemblance et Inférence Bayesienne.

2.4.2. Méthodes de distances

Pour cette méthode, la construction d'un arbre phylogénétique est basée sur les ressemblances observées entre chaque paire d'unités évolutives, soit la ressemblance globale établie à partir du maximum d'observations disponibles.

La première étape est le calcul des distances : la distance observée est la comparaison des séquences par paires afin d'évaluer simplement leurs similitudes et différences selon la formule :

$$D = 1 - S \qquad \text{où} \qquad S = M / L$$

(avec D : distance observée ; S : similarité ; M : nombre de sites synonymes et L : longueur de la séquence)

Le calcul de cette distance observée est simple, toutefois, il s'agit très souvent d'une sous-estimation de la distance réelle. En effet, ce dernier ne prend pas en compte les évènements d'évolution se produisant depuis l'ancêtre commun. Pour en tenir compte, différents modèles ont été développés afin de corriger les erreurs de calcul de distances :

- Modèle de Jukes-Cantor (JC) : modèle à 1 paramètre
  - Les 4 bases ont les mêmes fréquences ($\pi A = \pi T = \pi G = \pi C$)
  - Les transitions (α) et les transversions sont équiprobables ($\alpha = \beta$)
- Modèle de Kimura (K2P) : modèle à 2 paramètres
  - Les 4 bases ont les mêmes fréquences ($\pi A = \pi T = \pi G = \pi C$)
  - Les transitions (α) et les transversions ne sont pas équiprobables ($\alpha \neq \beta$)
- Modèle de Tajima-Nei (TN) = Felsenstein (F81) : modèle à 6 paramètres
  - Les 4 bases ont des fréquences différentes ($\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$)
  - Les transitions (α) et les transversions sont équiprobables ($\alpha = \beta$)
- Modèle de Hasegawa, Kishino et Yano (HKY85) : modèle à 6 paramètres
  - Les 4 bases ont des fréquences différentes ($\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$)
  - Les transitions (α) et les transversions ne sont pas équiprobables ($\alpha \neq \beta$)

- Modèle GTR (General Time Reversible) : modèle à 10 paramètres

  Les 4 bases ont des fréquences différentes ($\pi A \neq \pi T \neq \pi G \neq \pi C$)

  Il existe 6 types de substitutions (AC, AT, AG, CT, CG, TG)

A ces différents modèles s'ajoutent des paramètres additionnels de correction. La distribution gamma (Γ) est un facteur de correction des variations de substitutions entre les différents sites. Ce paramètre ne s'applique qu'aux sites libres de varier. La fraction de sites invariables sera évaluée par un second paramètre additionnel, la proportion de sites invariables (I).

Une fois établie, la matrice de distances va servir à construire l'arbre phylogénétique de distances. Pour se faire, deux méthodes existent. La méthode UPGMA est une méthode agglomérative (cluster analysis) regroupant entre elles les séquences les plus proches. Toutefois, cette méthode est peu utilisée, car elle nécessite que les distances soient ultra-métriques, c'est-à-dire évoluant avec une vitesse constante, hypothèse rarement confirmée. La seconde méthode est celle du Neighbor Joining (NJ). Elle correspond au calcul de la longueur des branches, telles que les distances déduites de l'arbre soient les plus proches des distances mesurées entre les séquences. Elle calcule ensuite la longueur de l'arbre en additionnant la longueur de ses branches.

Les méthodes de distances sont simples et rapides, permettant ainsi l'analyse de grandes bases de données. Cependant, la réduction de la matrice de caractères à une matrice de distance peut induire la perte d'une certaine part de l'information.

2.4.3. Méthodes de caractères

2.4.3.1. Méthode de Parcimonie

La construction phylogénétique selon le principe de parcimonie consiste, pour un groupe d'espèces, à considérer le plus faible nombre de changements évolutifs. La longueur de l'arbre sera donc la somme du nombre de changements pour chacun des sites informatifs. Les sites sont informatifs lorsqu'au moins deux caractères sont présents dans ce site, et lorsque chacun de ces caractères est présent dans au moins deux séquences comparées. Lorsque tous les sites informatifs sont identifiés, le logiciel identifie toutes les topologies d'arbre possibles, calcule le nombre de substitutions pour chacun des sites et, en additionnant tous ces changements évolutifs, déterminent l'(es) arbre(s) le(s) plus court(s). Parallèlement, le taux d'homoplasie est évalué à l'aide de deux indices afin de déterminer l'indice de confiance de l'arbre obtenu. Il s'agit de l'indice de cohérence

(CI) qui est le rapport du nombre de changements possibles sur le nombre de changements observés pour tous les caractères, et l'indice des homoplasies (HI) avec HI = 1 – CI.

La parcimonie est une méthode permettant d'obtenir une information sur les séquences ancestrales. Toutefois, seule une partie de l'information est utilisée (sites informatifs), et cette méthode ne permet pas de calculer la longueur de chaque branche.

2.4.3.2. Maximum de Vraisemblance (ML)

Cette méthode recherche, selon une théorie probabiliste, la vraisemblance des données selon différentes hypothèses évolutives, et conserve les hypothèses rendant cette vraisemblance maximale.

$$L = Pr (D / H)$$

Chaque base de chaque site est considérée séparément et le log de la vraisemblance est calculé pour une topologie donnée, selon un modèle de probabilité. La somme de tous ces log est ensuite maximisée afin d'estimer la longueur des branches de l'arbre. Une fois toutes les topologies évaluées, celle ayant la plus haute vraisemblance est choisie. Actuellement, le maximum de vraisemblance est la méthode la plus utilisée et celle qui conduit au résultat le plus proche de l'arbre évolutif réel. Cependant, pour l'analyse de bases de données importantes, elle demande une puissance de calcul importante.

2.4.3.3. Inférences Bayesiennes

Tout comme le ML, l'inférence bayesienne est une méthode probabiliste, mais faisant appel au concept de probabilités postérieures (théorème de Bayes).

$$Pr (H / D) = [Pr (D / H) \times Pr (H)] / Pr (D)$$

(avec H : arbre phylogénétique hypothétique ; D : séquences comparées)

Lors du calcul, la probabilité postérieure de chaque topologie est approximée selon la méthode de Monte Carlo par chaînes de Markov (MCMC) qui échantillonne des arbres suivant la proportion de leur probabilité postérieure.

2.4.4. Evaluation des arbres

Différentes méthodes permettent de définir la pertinence des arbres obtenus et ainsi rechercher celui se rapprochant le plus de l'arbre évolutif réel. La recherche exhaustive consiste à calculer la longueur de tous les arbres et de conserver uniquement ceux pour lequel la longueur est minimale. Le branch and bound utilise un algorithme exact. Après chaque recherche d'arbre, celui possédant la longueur la plus courte est conservé, devenant ainsi l'arbre de référence pour la suite de la recherche. La méthode heuristique consiste à construire un arbre initial qui sera ensuite réarrangé de manière à diminuer au maximum sa longueur.

La robustesse de chaque arbre peut également être évaluée. Le Bootstrap permet ainsi de tester la fiabilité des branches internes en effectuant un tirage au sort de chaque site au hasard avec remise, produisant ainsi différents alignements artificiels correspondant à autant d'arbres artificiels. Pour chaque branche, on calcule le pourcentage d'arbres artificiels contenant cette branche.

2.4.5. Analyses phylogénétiques appliquées à l'étude

Les analyses phylogénétiques basées sur les domaines D2, ITS-2, ITS-1 de l'ADNr des furcocercaires, œufs et adultes ont été réalisées en comparant les séquences obtenues lors de nos différentes études avec celles disponibles dans GenBank. La séquence de *S. mansoni* a servi de groupe extérieur ("outgroup"). L'alignement des séquences a été réalisé en utilisant ClustalW présent dans le logiciel MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) et corrigé à la main. Les alignements proposés comprennent donc les séquences des parasites isolés à partir des échantillons de l'étude, ainsi que les séquences disponibles dans GenBank pour ces différents domaines.

Le modèle et les paramètres utilisés lors des différentes analyses ont été obtenus par le logiciel Modeltest 3.7 (Posada et Crandall, 2001). Les analyses en Neighbor-Joining ont été réalisées selon le modèle Tajima-Nei à partir du logiciel MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Les analyses en Maximum de Vraisemblance ont été réalisées à l'aide du programme PHYML Online (Guindon *et al.*, 2005). Les analyses en Parcimonie ont été réalisées à partir du logiciel MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), en utilisant la recherche de l'arbre le plus parcimonieux par la méthode du «Maxi-Mini Branch and Bound ». Pour toutes ces analyses, les nœuds ont été supportés par calcul de 500 Bootstraps et les gaps traités comme étant des données manquantes. Les analyses phylogénétiques en Inférence Bayesienne ont été réalisées à l'aide du logiciel MrBayes 3.1.1 (Huelsenbeck et Ronquist, 2001); 4 chaînes de Monte Carlo Markov simultanées (température 0.2) ont été exécutées pour 1000000 de générations et échantillonnées toutes les 100 générations.

Les 1000 premiers arbres ont été rejetés. Dans les cas où tous les arbres obtenus pour un même domaine possédaient la même topologie, un seul fut représenté.

RÉSULTATS : Partie I

Trichobilharzies et Mollusques

3.1. Prévalences

A partir du ramassage des mollusques sur les différents sites prospectés, entre juin 2004 et octobre 2008, 5742 mollusques appartenant à 5 genres ont été testés quant à leur potentialité à émettre des furcocercaires ocellées. Aucune émission de furcocercaires ocellées n'a été observée à partir de mollusques du genre *Stagnicola*, *Bithynia* ou de la famille des Physidae. Seul un représentant du genre *Lymnaea* (*L. stagnalis*) et des représentants du genre *Radix* ont permi de détecter des furcocercaires à ocelles pigmentés après les tests d'émission. Des cercaires (type Echinostomidae, Xiphidiocercariae, Notocotylidae), retrouvées lors de nos émissions, ont également été conservées ainsi que les mollusques émetteurs pour des études ultérieures.

3.1.1. Plans d'eau à vocation récréative

Sur les 3815 mollusques provenant des sites des agglomérations d'Annecy, de Beauvais et de Strasbourg, seuls des mollusques appartenant au genre *Radix* ont émis des furcocercaires ocellées. La plus forte prévalence fut observée sur le plan d'eau de Strasbourg. Les résultats figurent dans le Tableau I. Sur la base de caractères morphologiques simples, les mollusques du genre *Radix* ramassés à Annecy semblaient appartenir à l'espèce *R. peregra* sensu Bargues *et al.* (2001), ce qui tranche avec la reconnaissance unique de *R. auricularia* sur les sites de Strasbourg et de Beauvais.

Tableau I : Prévalences des furcocercaires ocellées à ocelles pigmentés (FO) observées sur les différents lieux de baignade

Espèces	Origine	Testés	Positifs (FO)	Prévalences (%)
Radix sp.	Annecy	1492	12	0,80
	Beauvais	953	4	0,41
	Strasbourg	368	6	1,6
Lymnaea stagnalis	Beauvais	3	0	0
Bithynia sp.	Annecy	10	0	0
	Beauvais	932	0	0
Planorbidae	Beauvais	1	0	0
Physidae	Beauvais	56	0	0

FO = furcocercaire à ocelles pigmentés

3.1.2. Lac du Der-Chantecoq

1927 mollusques ont été ramassés sur le site du lac du Der-Chantecoq et dans les zones refuges environnantes. A la différence des autres lieux de prélèvement, un nombre important de *Lymnaea stagnalis* fut observé et analysé (Tableau II). L'émission de furcocercaires à ocelles pigmentés a été observée pour des représentants du genre *Radix* et pour les espèces *Lymnaea stagnalis* et *Planorbarius corneus*.

Tableau II : Prévalences des furcocercaires ocellées à ocelles pigmentés (FO) observées au lac du Der-Chantecoq

Espèces	Testés	Positifs (FO)	Prévalences (%)
Radix sp.	645	2	0,31
Lymnaea stagnalis	609	6	0,98
Bithynia sp.	13	0	0
Planorbidae	328	2	0,6
Stagnicola sp.	100	0	0
Physidae	232	0	0

FO = furcocercaire à ocelles pigmentés

Les cercaires ocellées isolées sur Planorbidae possédaient des fourchons plus courts que ceux observés chez les cercaires des autres mollusques émetteurs (Figure 12), caractéristique retrouvée pour celles de *Bilharziella polonica*.

Lors des tests d'émission, les *Planorbarius* n'ont émis ces cercaires que plusieurs jours après le début des tests et plutôt en fin de journée. L'un des mollusques a été maintenu dans de l'eau minérale pendant plusieurs mois à une température comprise entre 0 et 4°C. Après ce séjour d'environ trois mois, et suite à un nouvel éclairement d'une heure, de nouvelles émissions de furcocercaires ont pu être observées.

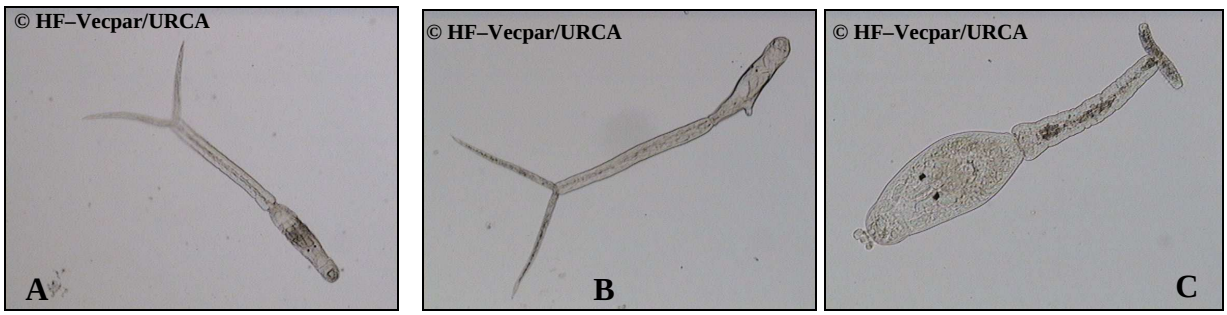


Figure 12 : Morphologie des Furcocercaires à ocelles pigmentés :
A : sur *Radix* sp. ; **B** : sur *Lymnaea stagnalis* ; **C** : sur *Planorbarius corneus*

3.2. Diversité haplotypique des furcocercaires par caractérisation moléculaire

Au total, sur les différents sites étudiés, 32 furcocercaires ocellées ont été isolées et leurs ADN respectifs extraits, amplifiés et séquencés afin de déterminer, par comparaison avec les séquences disponibles dans les banques de données, à quel taxon les rattacher.

Sur la base des résultats du séquençage, nous avons identifié *Trichobilharzia szidati, T. franki, T. regenti* et *Bilharziella polonica*, mais aussi reconnu d'autres haplotypes différents des espèces jusqu'alors connues en Europe à l'exception de *T. salmanticensis* dont la séquence n'est pas disponible à l'heure actuelle. Couplée à ces investigations, l'identification des mollusques, elle aussi moléculaire, a permis de mettre en évidence au sein d'un complexe épidémiologique particulier (lac d'Annecy), le rôle potentiel de *Radix peregra* sensu Bargues *et al*. (2001) en tant qu'hôte intermédiaire des Trichobilharzies.

3.2.1. *Trichobilharzia* spp. in natural conditions in Annecy Lake, France (Jouet *et al.*, 2008).

Suite à une demande des autorités locales du lac d'Annecy, après l'apparition de nombreux cas de dermatite cercarienne, une épidémiosurveillance fut menée entre 2003 et 2006 afin de contrôler la prévalence des Schistosomes aviaires dans les populations de mollusques et d'oiseaux aquatiques, les isoler et les identifier. Cette étude fait suite à un travail similaire mené en 2005 par Ferté *et al*. sur le site du lac du Der-Chantecoq.

Parasitol Res (2008) 103:51–58
DOI 10.1007/s00436-008-0926-3

ORIGINAL PAPER

Trichobilharzia spp. in natural conditions in Annecy Lake, France

Damien Jouet · Hubert Ferté · Jérôme Depaquit · Jitka Rudolfová · Pierre Latour · Damien Zanella · Matthieu L. Kaltenbach · Nicole Léger

Received: 17 January 2008 / Accepted: 6 February 2008 / Published online: 5 March 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Annecy Lake is a well-known focus of human cercarial dermatitis in France. Identification of the parasites, however, was not performed in the past. Previous studies suspected two species, *Trichobilharzia franki* and *Trichobilharzia regenti*, based on the presence of parasites in mallards and/or morphological identification of snails emitting ocellate furcocercariae. Following a standardized molecular approach, we studied snails and furcocercariae and compared their haplotypes with those deposited in GenBank. The selected markers were the second internal transcribed spacer ITS-2 for the snails and ITS-2 and D2 domain of the ribosomal DNA for the parasites. Our results confirm the presence of *T. franki* and *T. regenti* and two probable new species that could be potential agents of cercarial dermatitis. All the snails emitting the ocellate furcocercariae belong to the same species identified as *Radix peregra* (=*Radix ovata* = *Radix balthica*). Parasite–host relationships between species of the genus *Trichobilharzia* and snails of the genus *Radix* do not seem to be as specific as supposed previously.

D. Jouet · H. Ferté (✉) · J. Depaquit
USC AFSSA « VECPAR », UFR de Pharmacie,
Université de Reims Champagne—Ardenne,
51 rue Cognacq-Jay,
51096 Reims, France
e-mail: hubert.ferte@univ-reims.fr

J. Rudolfová
Faculty of Science, Department of Parasitology,
Charles University in Prague,
Vinični 7,
128 44 Prague 2, Czech Republic

P. Latour · D. Zanella
SILA,
7 rue des Terrasses,
74962 Cran-Gevrier, France

M. L. Kaltenbach
Laboratoire de Pharmacologie, UFR de Pharmacie,
Université de Reims Champagne—Ardenne,
51 rue Cognacq-Jay,
51096 Reims, France

N. Léger
63 avenue Pierre Semard,
94210 La Varenne Saint Hilaire, France

Introduction

In Europe, larvae (ocellate furcocercariae) of the avian schistosomes are known as the most important causative agents of human cercarial dermatitis (HCD), which is considered as an emerging disease in various recreational lakes (de Gentile et al. 1996; Horák et al. 2002; Verbrugge et al. 2004). In the past, ocellate furcocercariae were mostly determined as *Trichobilharzia ocellata* (LaValette 1855) Brumpt 1931. Rudolfová et al. (2005) reviewed the taxonomic status of this species and concluded that *Trichobilharzia szidati* Neuhaus 1952 should be the correct name for cercariae usually released from *Lymnaea stagnalis* snails in Europe. Four species of the genus *Trichobilharzia* are now considered as potential agents of HCD in Europe: *T. szidati* Neuhaus 1952; *Trichobilharzia franki* Müller and Kimmig 1994; *Trichobilharzia regenti* Horák, Kolářová and Dvořák 1998; and *T. salmanticencis* Simon-Martin and Simon-Vicente 1999. In France, Ferté et al. (2005) used molecular systematics as an approach to study agents of HCD from naturally infected molluscs living in the artificial Der-Chantecoq Lake. They identified the cercariae as *T. szidati* and *T. franki*, emitted by *L. stagnalis* and *Radix auricularia*, respectively. Annecy Lake is a tourist area,

where swimming is an important activity in the summer season, but it also serves as a reserve of avifauna (migratory and nonmigratory birds). It is the most active French focus of HCD, where a lot of cases were reported (Léger and Martin-Loehr 1999; Caumes et al. 2003). The increase in HCD cases since 1994 led to the development of two strategies to reduce its incidence: (1) control of the resident population of mallards by hunting and (2) destruction of snails by crushing with a custom-made machine. Although identification of the parasite has never been confirmed, morphological determination of infected snails (identified as *Radix peregra* and *R. auricularia*) and the presence of eggs in the nasal cavity or mesenteric vessels of aquatic birds indicate the presence of *T. regenti* and/or *T. franki*. Furthermore, some ocellate furcocercariae emitted by positive snails were used for studies of visceral lesions in experimentally infected mammals and birds (Bayssade-Dufour et al. 2001, 2002). The aim of this work was thus to compare the haplotypes of the ocellate furcocercariae from the Annecy Lake with those of the genus *Trichobilharzia* deposited in GenBank and to determine their relationships with molluscs as intermediate hosts.

Materials and methods

Annecy Lake is located in southeastern France in the French Alps. According to the strategy of local authorities, water birds were killed during the winters of 2002 and 2003; 110 heads were collected and preserved in formalin: 99 of *Anas platyrhynchos* (mallards), four of *Aythya fuligula* (tufted duck), and seven of *Aythya ferina* (pochard). Examination of birds for nasal schistosomes (eggs and miracidia) was performed after perfusion of nostrils with water. In addition, five mallards were freshly autopsied in the summer of 2004 and eggs or miracidia from their nasal cavity were preserved in 70% ethanol.

During the periods of snail destruction, 1,636 snails were collected by hand around places where HCD cases had been usually recorded: 35 in June 2004, 100 in July 2004, and 1,501 in April–May 2006. They were pooled by ten in Petri dishes and cercarial emergence was stimulated by lighting for 30 min to 1 h in the laboratory. Snails from positive batches were individually isolated for a second assay. Screening of cercariae was performed using morphological features proposed by Combes et al. (1980). Furcocercariae with pigmented eye spots were preserved in 95% ethanol and frozen (−20°C) until the DNA analysis. Positive snail hosts were frozen directly at −20°C in individual sterile bags for storage. Sequencing of the second internal transcribed spacer (ITS-2) and D2 domain of the 28S of the ribosomal DNA (rDNA) was used for the identification of furcocercariae from naturally infected snails. ITS-2 was also used at the species level for snail typing. Samples sequenced in the present study are listed in Table 1.

DNA extraction was done using the Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. During the first step (tissue lysis), cercariae or a small part of the foot of each positive snail was crushed one by one using a piston pellet (Treff, Degersheim, Switzerland). DNA was eluted in 50 μl of the elution buffer provided. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 50-μl volume using 5 μl of DNA and 50 pmol of each of the primers. The PCR mix contained (final concentrations) 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01% Triton X 100, 200 μM dNTP each base, and 1.25 units of *Taq* polymerase (Eppendorf, Hamburg, Germany). ITS-2 of furcocercariae was amplified using primers ITS3Trem (5′-GCGTCGATGAAGAGTG CAGC-3′) and ITS4Trem (5′-TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3′) (Dvořák et al. 2002). Their D2 domain was amplified using the primers used by Mollaret et al. (1997): C2'B (5′-GAAAAGTACTTTGRARAGAGA-3′) and D2 (5′-TCCGTGTTTCAAGACGGG-3′). For the amplification

Table 1 Isolates of bird schistosomes used for phylogenetic analysis

Determination	Isolate	Stage	Host	Locality	Latitude/ longitude	Date
Trichobilharzia sp.	DOUC1	Cercariae	*Radix* sp. (DOU1)	Annecy Lake, France	45°51′N, 6°10′ E	Oct. 2002
Trichobilharzia sp.	CAN1	Miracidia	*Anas platyrhynchos*	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	June 2004
Trichobilharzia sp.	CAN3	Miracidia	*Anas platyrhynchos*	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	June 2004
Trichobilharzia sp.	CAN5	Eggs	*Anas platyrhynchos*	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	June 2004
Trichobilharzia sp.	EAN9	Cercariae	*Radix* sp. (RAN5)	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	July 2004
Trichobilharzia sp.	EAN17	Cercariae	*Radix* sp. (RAN8)	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	July 2004
Trichobilharzia sp.	EAN30	Cercariae	*Radix* sp. (RAN17)	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	Aug. 2004
Trichobilharzia sp.	EAN31	Cercariae	*Radix* sp. (RAN18)	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	Aug. 2004
Trichobilharzia sp.	EAN35	Cercariae	*Radix* sp. (RAN22)	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	Aug. 2004
Trichobilharzia sp.	EAN57	Cercariae	*Radix* sp. (RAN57)	Annecy Lake, France	45°51′ N, 6°10′ E	May 2006

of the positive snails, the universal primers C1a (5′-CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3′) and ITS3 (5′-GTCGATGAAGAACGCAGC-3′) were used according to Bargues et al. (2001). Moreover, we have designed the primers DIX1 (5′-CGCGCTCTGGWCCKTCGCGGC-3′) and DIX2 (5′-ATYTYGTYCGATTTGAGGTTG-3′) to amplify the ITS2 of *Radix* spp. For cercariae, initial denaturation at 94°C for 3 min was followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 50°C for 45 s, and extension at 68°C for 2 min with a final elongation time of 10 min at 68°C. For snails, initial denaturation at 94°C for 3 min was followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 57°C for 30 s, and extension at 68°C for 1 min, with a final elongation time of 10 min at 68°C. PCR products were directly sequenced in both directions with the primers used for DNA amplification. The sequences were deposited in GenBank under accession numbers EU413960 to EU413986.

Phylogenetic analyses based on the D2 and ITS-2 domain sequences (554 and 322 bp, respectively) of the furcocercariae were performed comparing sequences obtained in the present study (Table 1) with those of *T. regenti*, *T. szidati*, *T. franki*, *Trichobilharzia* sp., *Allobilharzia visceralis*, *Dendritobilharzia pulverulenta*, *Gigantobilharzia huronensis*, and *Bilharziella polonica*, downloaded from GenBank (Table 2). Sequences of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* served as outgroup.

For snails, phylogenetic analyses of the ITS-2 domain (392–396 bp) were performed using the sequences obtained in this study (Table 1) and those of *R. peregra*, *R. auricularia*, *Radix ampla*, *Radix lagotis*, *Radix labiata*, and *Radix* sp. downloaded from GenBank (Table 3). Sequences of *L. stagnalis* served as outgroup.

Sequence alignment was performed using the ClustalW routine included in the MEGA version 3.1 software (Kumar et al. 2004) and checked by eye. The regions D2 and ITS2 exclusively were used for tree constructions and rooted with the outgroup taxon. The maximum likelihood (ML) analysis was performed in PHYML Online (Guindon et al. 2005) with the HKY + Γ model [model and parameters were chosen using the hierarchical likelihood ratio test implemented in Modeltest 3.7 (Posada and Crandall 2001)] and node support assessed by bootstrapping (500 replicates). Maximum parsimony (MP) analysis was performed in PAUP 4.0 (Swofford 2002) using the heuristic algorithm;

Table 2 GenBank sequences of bird schistosomes used for phylogenetic analysis

Determination	Accession number	Marker	Stage	Origin
Schistosoma mansoni	Z46503	D2	Adult	Puerto Rico
	SMU22168	ITS2	Adult	Puerto Rico
Schistosoma haematobium	Z46521	D2	Adult	Mali
	AF146037, AF146038	ITS2	Adult	Kenya
	AF146036	ITS2	Adult	Egypt
Trichobilharzia regenti	AY157244	D2	Cercariae	Czech Republic
	AF263829	ITS2	Cercariae	Czech Republic
	EF094533, EF094534, EF094535	ITS2	Eggs	Poland
	EF094537	ITS2	Eggs/adult	Poland
	EF094538, EF094540	ITS2	Eggs/miracidia	Czech Republic
Trichobilharzia franki	AF356845, AY713969, AY713973	ITS2	Cercariae	Czech Republic
	AY713964, AY713966	ITS2	Cercariae	Poland
Trichobilharzia szidati	AY157245	D2	Cercariae	Czech Republic
	AF263828, AY713961, AY713965, AY713968, AY713972	ITS2	Cercariae	Czech Republic
	AY713971	ITS2	Cercariae	Germany
	AY713970	ITS2	Cercariae	Netherlands
	AY713967	ITS2	Cercariae	Poland
	EF094530, EF094536	ITS2	Eggs	Poland
	EF094541	ITS2	Adult	Czech Republic
Trichobilharzia sp.	EF094531, EF094532	ITS2	Eggs	Poland
Allobilharzia visceralis	DQ067561	ITS2	Adult	Iceland
	EF071989, EF071990, EF071991	ITS2	Adult	USA
Gigantobilharzia huronensis	AF167091, AY157242	D2	Adult	USA
	EF071986, EF071987	ITS2	Adult	USA
Dendritobilharzia pulverulenta	AY157241	D2	Adult	USA
	AY713962, EF071988	ITS2	Adult	USA
Bilharziella polonica	DQ813437	D2	Adult	France

Table 3 GenBank sequences of snails used for phylogenetic analysis

Determination	Accession number	Origin
Radix auricularia	AJ319628	Czech Republic, Austria, UK
	AJ319629	Czech Republic
	AJ319630, AJ319631, AJ319632, AY795574	France
Radix peregra (=R. ovata = R. balthica)	AJ319633	France, the Netherlands, Spain, Iceland
	AJ319634, AJ319635	France
Radix labiata	AJ319636	Turkey
	AJ319637	Germany
Radix lagotis	AJ319638	Czech Republic
	AJ319639	Austria
Radix ampla	AJ319640	Austria
Radix sp.	AJ319641	Turkey
Lymnaea stagnalis	AJ319614	Germany
	AJ319615, AJ319616	France
	AJ319617	Italy, France, Germany

the tree space was searched by ten replicates, with starting tree constructed by random taxa addition and tree-bisection-reconnection swapping, and internal nodes support assessed by bootstraping over 1,000 replications. For both of MP and ML analysis, gaps were treated as missing data. Phylogenetic analysis of Bayesian inference (BI) was performed using MrBayes 3.1.1 (Huelsenbeck and Ronquist 2001); four simultaneous Markov Monte Carlo chains (temperature 0.2) were run for 1,000,000 generations under a HKY + Γ substitution model and sampled every 100 generations. The first 10,000 trees were discarded as the "burnin."

Results

Eggs and/or miracidia of nasal schistosomes were found in 73 (70%) out of 104 *A. platyrhynchos*, two (50%) out of four *A. fuligula*, and one (14%) out of seven *A. ferina* examined. Only one (0.07%) out of 1,501 snails tested in May 2006 emitted ocellate furcocercariae, whereas four (3%) out of 135 snails were found positive from the batch collected in 2004.

The phylogenetic trees (Figs. 1 and 2), rooted on *S. haematobium* and *S. mansoni*, show *B. polonica* as a sister group of a clade including *Dendritobilharzia*, *Gigantobilharzia*, *Allobilharzia*, and *Trichobilharzia*. In this last clade, *Gigantobilharzia*-and-*Dendritobilharzia* and *Allobilharzia*-and-*Trichobilharzia* are sister groups in an ITS-2-based tree. The genus *Trichobilharzia* is divided into several branches: (1) isolate EAN17; (2) *T. szidati*; (3) *Trichobilharzia* sp. (only for ITS-2); (4) *T. franki* and isolates EAN30, EAN31, EAN57, and DOUC1; (5) isolate EAN35; and (6) *T. regenti* and isolates CAN1, CAN3, CAN5, and EAN9.

Within the *T. franki* group (4), the furcocercariae from Annecy included in the study were found to be identical. They were 100% homologous. Based on the lack or the small variability within D2 and ITS-2 rDNA sequences among specimens sequenced in the present study and those deposited as *T. franki* in GenBank, we consider our samples to belong to this species. Likewise, in the *T. regenti* group (6), the isolates (ocellate furcocercariae and nasal stages) were all identical. Isolates EAN17 and EAN35 differ in

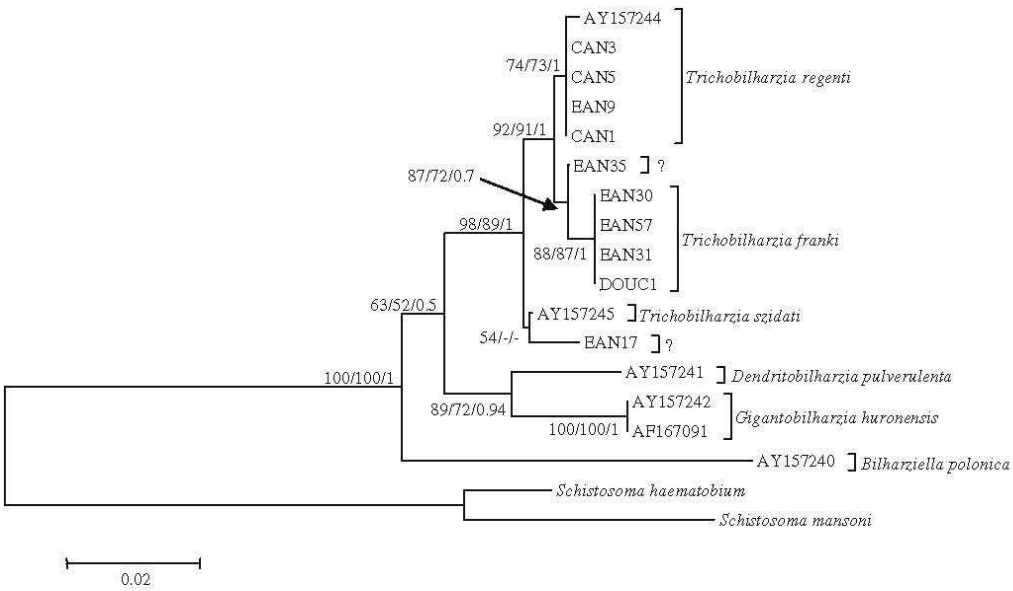


Fig. 1 Phylogenetic tree based on the D2 domain of rDNA of ocellate furcocercariae and sequences of bird schistosomes (genera *Bilharziella*, *Gigantobilharzia*, *Dendritobilharzia*, and *Trichobilharzia*) constructed using the ML method in Phyml (HKY + Γ model of substitution). The *scale* shows the number of nucleotide substitutions per site between DNA sequences. *S. haematobium* and *S. mansoni* were set as outgroup. The node support is given in ML bootstraps, MP bootstraps, and Bayesian posterior probability

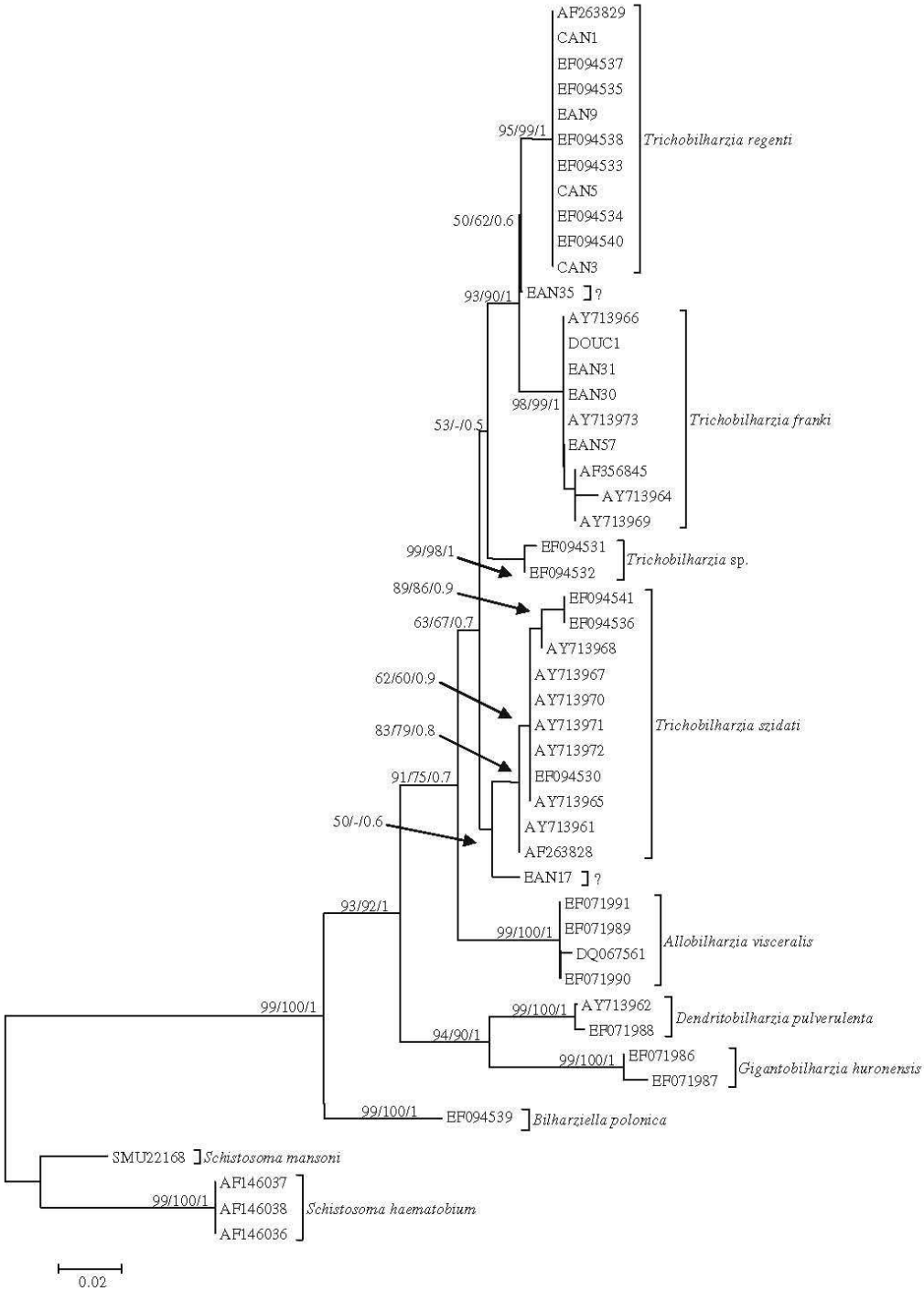


Fig. 2 Phylogenetic tree based on the ITS-2 domain of rDNA of ocellate furcocercariae and sequences of bird schistosomes (genera *Bilharziella*, *Gigantobilharzia*, *Dendritobilharzia*, *Allobilharzia*, and *Trichobilharzia*) constructed using the ML method in Phyml (HKY + Γ model of substitution). The *scale* shows the number of nucleotide substitutions per site between DNA sequences. *S. haematobium* and *S. mansoni* were set as outgroup. The node support is given in ML bootstraps, MP bootstraps, and Bayesian posterior probability

ITS-2 and D2 sequences from those of other specimens coming from Annecy and from the known database.

All ML, parsimony, and Bayesian analyses indicated that the clade of *Trichobilharzia* is strongly supported by bootstrap and BI values. EAN 35 appears as a sister group of *T. franki* in D2 (strongly supported) and as a sister group of *T. regenti* in ITS-2, but these results are not strongly supported by the different values. EAN 17 appears to be the sister group of *T. szidati* according to MP, ML, and BI analyses carried out on both D2 and ITS2 data sets (strongly supported in D2, but not for ITS-2).

The phylogenetic trees based on ITS-2 sequences of snail isolates (Fig. 3), rooted on *L. stagnalis*, show four different clades: the first is formed by *R. labiata*, the second by *R. auricularia* and *Radix* sp., the third by *R. ampla* and *R. lagotis*, and the fourth by *R. peregra* (=*ovata*; = *balthica*) and isolates RAN5, 8, 17, 18, 57, and DOU1. Even if the haplotypes of ITS2 from snails showed diversity (two to nine variable sites for the group of *R. peregra* and isolates from Annecy), all snails emitting furcocercariae, except DOU1, were included in the *R. peregra* (=*Radix ovata*; = *Radix balthica*) group, which was strongly supported.

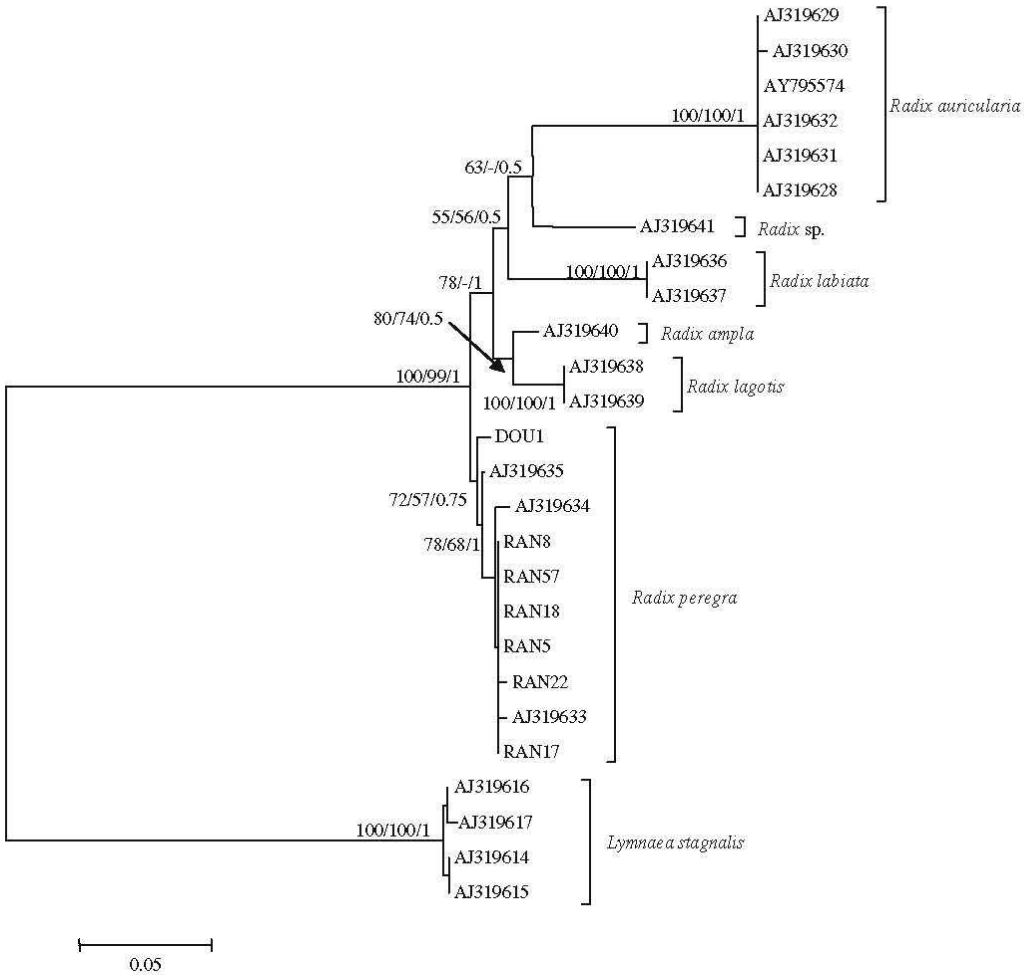


Fig. 3 Phylogenetic tree based on the ITS-2 domain of rDNA of snails constructed using the ML method in Phyml (HKY + Γ model of substitution). The *scale* shows the number of nucleotide substitutions per site between DNA sequences. *L. stagnalis* was set as outgroup according to Bargues et al. (2001). The node support is given in ML bootstraps, MP bootstraps, and Bayesian posterior probability

However, DOU1 is closer to this group than to the other species.

Discussion

In 2006, the prevalence of infected *Radix* sp. in Annecy Lake (0.07%) is comparable to that reported in other surveys (Kolářová et al. 1992; Loy and Hass 2001; Ferté et al. 2005). The decrease between 2004 (3%) and 2006 (0.07%) can be explained by the efficacy of the control of the sedentary population of mallards and by the destruction of snails performed since 2001.

Rudolfová et al. (2005) consider the following methods to be the most useful for species identification: experimental infection with morphological determination of the adults, which is the most difficult one, and sequence analysis. The latter approach seems to be of wider use. According to different sequencing results found previously, the main avian clade includes five genera of exclusively avian parasites: *Trichobilharzia*, *Allobilharzia*, *Dendritobilharzia*, *Gigantobilharzia*, and *Bilharziella* (Snyder and Loker 2000; Lockyer et al. 2003, Kolářová et al. 2006). ITS-1 and ITS-2 were then used for *Trichobilharzia* identification (Picard and Jousson 2001; Dvořák et al. 2002; Ferté et al. 2005; Kolářová et al. 2006; Rudolfova et al. 2005, 2007; Brant et al. 2007); the results of our sequence comparisons and analyses in this study suggest that the D2 domain seems to be a useful DNA marker for resolving species identification in avian schistosomes, too. The identification of the haplotypes of *T. franki* and *T. regenti* confirms the presence of these two species in Annecy Lake. However, this finding does not rule out the presence of other causative agents, as two furcocercariae with new specific haplotypes (EAN17 and EAN35) found in our study. Regarding their positions in the trees and their molecular variability, we consider that EAN35 and EAN17 belong to the genus *Trichobilharzia*, but it is not possible to describe new species on the basis of larval stage exclusively. Their statuses have to be explored in the future, having access to other stages of the parasites and other molecular markers.

Morphological identification of snails of the genus *Radix* based on the external features (shell size and shape) seems to be impossible because of continuous variability and plasticity of these characters depending on environmental conditions (Pfenninger et al. 2006). On the other hand, the molecular approach is supposed to be a consensual and

comparable method according to Bargues et al. (2001) and Pfenninger et al. (2006). Unfortunately, its use is not applicable in routine diagnosis in the field. Moreover, existing studies on molecular taxonomy of the genus *Radix* use different markers; therefore, they are not comparable. Bargues et al. (2001) used ITS-2 for phylogenetic analysis of European lymnaeid snails. They distinguished six species: *R. auricularia*, *R. ampla*, *R. peregra* (=*R. ovata*; = *R. balthica*), *R. labiata*, *R. lagotis*, and *Radix* sp. However, this study was based on a low number of specimens. Pfenninger et al. (2006) used mitochondrial gene for cytochrome oxidase I. The isolates *Radix* from different localities in Europe grouped into six clades, but no species names were assigned to them by the authors. In our study, ITS-2 was chosen for phylogenetic analysis. Isolates RAN5, 8, 17, 18, 22, and 57 were grouped with *R. peregra* (=*R. ovata* = *R. balthica* sensu Bargues 2001); sample DOU1 does not belong to this group, but it is very close to it. This is the first report of one snail species to serve as the intermediate host for four different *Trichobilharzia* species—*T. franki*, *T. regenti*, and two unknown species (EAN17 and EAN 35). So far, *T. franki* has been reported to use *R. auricularia* as its natural intermediate host (Müller and Kimmig 1994), with the exception of one finding from *L. stagnalis* (Rudolfová et al. 2005). Experimental infections with *T. franki* proved that this species prefers *R. auricularia* but is able to infect and develop in *R. ovata* (corresponding to *R. peregra* sensu Bargues 2001) as well (Kock 2001). However, further evaluation of intermediate host specificity of bird schistosomes of the genus *Trichobilharzia* is impossible. This is due to the confusing situation within the systematics of the snail genus *Radix*, where different systems based on different determination approaches and numerous synonyms are used. Comprehensive revision is necessary. Future studies including other molecular markers should be carried out to further characterize isolates EAN17 and EAN35 and to match them with adults.

Acknowledgements The authors thank Monique Boutry, Chantal Grimplet, Emmanuel Liénard, and the technical staff of *Syndicat Mixte du Lac d'Annecy* (SILA) for their technical assistance and Bernard Pesson for proofreading this manuscript. Financial support for this study was provided by SILA and *Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage*, by the Czech Ministry of Education (Grants No. MSM0021620828 and No. MSM LC06009), and by the Czech Science Foundation (Grant No. 206/07/P092).

References

Bargues MD, Vigo M, Horák P, Dvořák J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas Coma S (2001) European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiases, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. Infect Genet Evol 1(2):85–107

Bayssade-Dufour C, Martins C, Vuong PN (2001) Histopathologie pulmonaire d'un modèle mammifère et dermatite cercarienne humaine. Med Mal Infect 31:713–722

Bayssade-Dufour C, Vuong PN, Rene M, Martin-Loehr C, Martins C (2002) Visceral lesions in mammals and birds exposed to agents of human cercarial dermatitis. Bull Soc Pathol Exot 95(4):229–37

Brant SV (2007) The occurrence of the avian schistosome *Allobilharzia visceralis* Kolářová, Rudolfová, Hampl et Skírnisson, 2006 (Schistosomatidae) in the tundra swan, *Cygnus columbianus* (Anatidae), from North America. Folia Parasitol 54:99–104

Caumes E, Felder-Moinet S, Couzigou C, Darras-Joly C, Latour P, Léger N (2003) Failure of an ointment based on IR3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) to prevent an outbreak of cercarial dermatitis during swimming race across Lake Annecy, France. Ann Trop Med Parasitol 97:157–163

Combes C, Albaret J-L, Bartoli P, Bayssade-Dufour C, Deblock S, Durette-Desset M-C, Gabrion C, Jourdane J, Lambert A, Léger N, Maillard C, Matricon M, Nassi H, Prevot G, Richard J, Theron A (1980) Atlas mondial des cercaires. Mem Mus Natl Hist Nat Paris Ser A 115:235

De Gentile L, Picot H, Bourdeau P, Bardet R, Kerjan A, Piriou M, Guennic AL, Bayssade-Dufour C, Chabasse D, Mott KE, Le Guennic A (1996) Cercarial dermatitis in Europe: a new public health problem? Bull World Health Organ 74(2):159–163

Dvořák J, Vaňáčová Š, Hampl V, Flegr J, Horák P (2002) Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS-1 and ITS-2 sequences. Parasitology 124(3):307–313

Ferté H, Depaquit J, Carré S, Villena I, Léger N (2005) Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern France: molecular evidence. Parasitol Res 95:150–154

Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005) PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. Nucleic Acids Res 33:W557–W559

Horák P, Kolářová L, Adema CM (2002) Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. Adv Parasitol 52:155–233

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) Mr Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17:754–755

Kock S (2001) Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae). Parasitology 123(1):67–70

Kolářová L, Horák P, Fajfrlík K (1992) Cercariae of *Trichobilharzia szidati* Neuhaus, 1952 (Trematoda: Schistosomatidae): the causative agent of cercarial dermatitis in Bohemia and Moravia. Folia Parasitol 39:399–400

Kolářová L, Rudolfová J, Hampl V, Skírnisson K (2006) *Allobilharzia visceralis* gen. nov., sp. Nov. (Schistosomatidae-Trematoda) from *Cygnus Cygnus* (L.) (Anatidae). Parasitol Int 55(3):179–86

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 5(2):150–63

Léger N, Martin-Loehr C (1999) La dermatite cercarienne: un désagrément des baignades estivales. Actual Pharm 377:49–50

Lockyer AE, Olson PD, Ostergaard P, Rollinson D, Johnston DA, Attwood SW, Southgate VR, Horák P, Snyder SD, LE TH, Agatsuma T, McManus DP, Carmichael AC, Naem S, Littlewood DT (2003) The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. Parasitology 126(3):203–24

Loy C, Haas W (2001) Prevalence of cercariae from *Lymnaea stagnalis* snails in a pond system in Southern Germany. Parasitol Res 87:878–882

Mollaret I, Jamieson BG, Adlard RD, Hugall A, Lecointre G, Chombard C, Justine JL (1997) Phylogenetic analysis of the Monogenea and their relationships with Digenea and Eucestoda inferred from 28S rDNA sequences. Mol Biochem Parasitol 90(2):433–8

Müller V, Kimmig P (1994) *Trichobilharzia franki* n. sp. - Die Ursache für Badedermatitiden in südwestdeutschen Baggerseen. Appl Parasitol 34:187–201

Pfenninger M, Cordellier M, Streit B (2006) Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). BMC Evol Biol 6:100

Picard D, Jousson O (2001) Genetic variability among cercariae of the Schistosomatidae (Trematoda: Digenea) causing swimmer's itch in Europe. Parasite 8:237–242

Posada D, Crandall KA (2001) Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. Syst Biol 50:580–601

Rudolfová J, Hampl V, Bayssade-Dufour C, Lockyer AE, Littlewood DT, Horák P (2005) Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host. Parasitol Res 95(2):79–89

Rudolfová J, Littlewood DTJ, Sitko J, Horák P (2007) Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland. Folia Parasitol 54:88–93

Snyder SD, Loker ES (2000) Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (Platyhelminthes: Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma*. J Parasitol 86:283–288

Swofford DL (2002) PAUP*. phylogenetic analysis using parsimony (*and others methods). Version 4. Sinauer, Sunderland

Verbrugge LM, Rainey JJ, Reimink RL, Blankespoor HD (2004) Swimmer's itch: incidence and risk factors. Am J Public Health 94(5):738–741

3.2.2. Données complémentaires

Suite à ces données préliminaires nous avons complété nos échantillons en vue de nouvelles analyses, en incorporant d'une part les nouvelles séquences obtenues à partir de mollusques récemment retrouvés infestés par des furcocercaires à ocelles pigmentés, mais aussi en nous appuyant sur l'analyse d'autres domaines moléculaires. L'ensemble des échantillons figure dans le Tableau III. Par commodité, nous avons associé la notion d'espèce pour des taxons partageant les mêmes haplotypes que ceux préalablement déposés dans GenBank. Pour l'identification des mollusques du genre *Radix*, les mêmes outils ont été utilisés. A nos exemplaires ont été ajoutées toutes les séquences de Schistosomes aviaires connues, ainsi que certaines séquences de Schistosomatidae susceptibles d'être utilisées comme out-group (Tableau IV).

Tableau III : Furcocercaires ocellées : matériel supplémentaire mis à disposition

Espèce	Mollusque	Localité	Réf érences BM
Trichobilharzia regenti	*Radix peregra**	Annecy	EAN78
Trichobilharzia franki	*Radix auricularia**	Beauvais	BERS1, BERS2, BERS67
		Strasbourg	STRS 2, STRS4, STRS5, STRS 6
		Annecy	EAN77
		Der-Chantecoq	FORS 4
	*Radix peregra**	Annecy	EAN 57, EAN79, EAN80
Trichobilharzia szidati	*Lymnaea stagnalis***	Aube	FOLS11
		Der-Chantecoq	FOLS 8
Trichobilharzia sp.	*Radix peregra**	Annecy	EAN 81
Bilharziella polonica	*Planorbarius corneus***	Der-Chantecoq	FOPS1, FOPS 2

Mollusques : * identification moléculaire **identification sur critères morphologiques

Tableau IV : Haplotypes utilisés et enregistrés dans GenBank

Espèce	Numéro d'Accession	Stade	Origine
*Schistosoma mansoni**	Z46503, SMU22168	adulte	Puerto Rico
Trichobilharzia regenti	AY157244, AF263829	cercaire	Rép. Tchèque
	AJ312047, AJ312048	cercaire	Suisse
Trichobilharzia franki	AF356845, AY713969, AY713973, AY157245	cercaire	Rép. Tchèque
	AY713964, AY713966	cercaire	Pologne
	De AJ312041 à AJ312046	cercaire	Suisse
	AY795572, AY795573	cercaire	France
Trichobilharzia szidati	AF263828, AY713961, AY713965, AY713968, AY713972, AY157245	cercaire	Rép. Tchèque
	AY713971	cercaire	Allemagne
	AY713970	cercaire	Pays-Bas
	AY713967	cercaire	Pologne
	AY795570, AY795571	cercaire	France
*Bilharziella polonica**	DQ813437	adulte	France

* haplotypes correspondant uniquement aux vers adultes

3.2.2.1. Statut moléculaire du genre *Trichobilharzia* en France

3.2.2.1.1. Analyse du domaine D2

L'alignement du domaine D2 comprend 549 pb pour *S. mansoni*, 552 pb pour *B. polonica*, *T. franki* (STRS2-4-5-6, BERS1-2-67, FORS4 et EAN77), *T. szidati* et *T. regenti*, et 553 pb pour *T. franki* (EAN57-79-80). L'alignement final comprend 26 taxons et sa taille est de 554 paires de bases, incluant les zones de délétions. Les sites variables intra et inter-spécifiques retrouvés au sein du groupe des Trichobilharzies sont représentés sur la Figure 13.

		75	126	144	212	259	263	265	330	360	361	363	414	462	500
Trichobilharzia regenti	EU413960	A	A	T	G	T	T	G	C	T	A	T	C	T	T
	EAN78	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
	AY157244	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
Trichobilharzia franki	BERS1	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	BERS2	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	BERS67	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	STRS2	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	STRS4	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	STRS5	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	STRS6	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	FORS4	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	FORS1	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	EAN77	•	G	•	•	•	•	•	T	C	T	A	T	•	•
	EU413962	•	G	•	•	C	•	•	T	•	T	A	•	•	•
	EU413963	•	G	•	•	C	•	•	T	•	T	A	•	•	•
	EU413965	•	G	•	•	C	•	•	T	•	T	A	•	•	•
	EU413966	•	G	•	•	C	•	•	T	•	T	A	•	•	•
	EAN79	•	G	•	•	C	•	•	T	•	T	A	•	•	•
	EAN80	•	G	•	•	C	•	•	T	•	T	A	•	•	•
Trichobilharzia szidati	FOLS1	•	•	•	A	•	G	A	T	•	•	A	•	•	•
	FOLS4	•	•	•	A	•	G	A	T	•	•	A	•	•	•
	FOLS8	•	•	•	A	•	G	A	T	•	•	A	•	•	•
	FOLS11	•	•	•	A	•	G	A	T	•	•	A	•	•	•
Trichobilharzia sp.2	EU413961	G	•	C	A	•	G	A	T	•	•	G	•	C	•
	EAN81	G	•	C	A	•	G	A	T	•	•	G	•	C	•
Trichobilharzia sp.1	EU413964	•	•	•	•	•	•	•	T	•	T	A	•	•	•

Figure 13 : Alignement des séquences partielles du domaine D2 des différents haplotypes de Trichobilharzies, représentant les variations entre les différentes espèces. Les bases identiques sont représentées par un point (•). Seuls les sites variables avec leur position donnée au-dessus sont présentés.

Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985). La fréquence des bases est F(A) = 0.1587 ; F(C) = 0.2001 ; F(G) = 0.3217 et F(T) = 0.3195. Le taux de transitions / transversions est de 3.8461, la proportion de sites invariables est nulle. 46 sites sont informatifs pour l'analyse en Parcimonie. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 14).

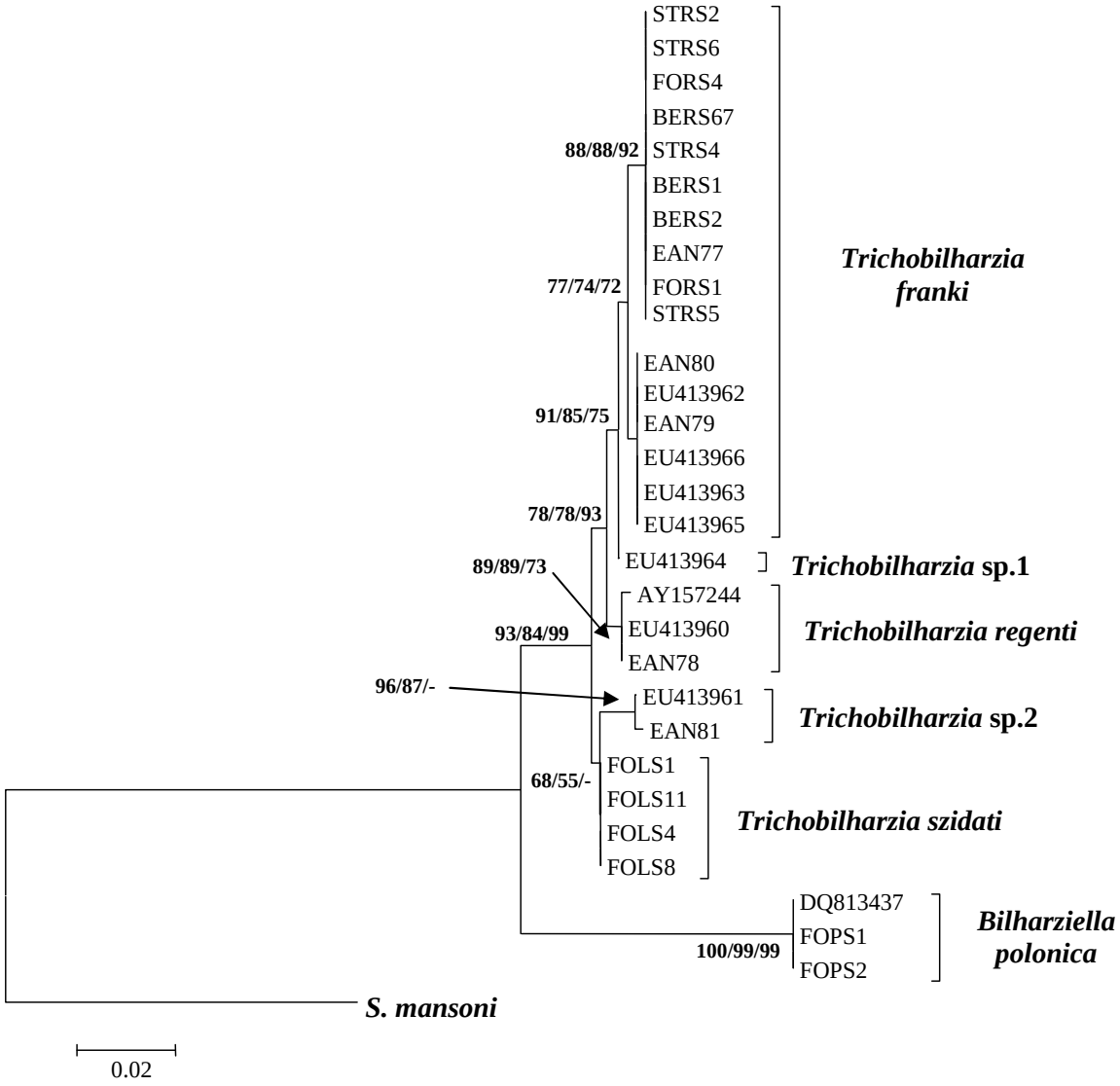


Figure 14: Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance du domaine D2 des différentes Furcocercaires ocellées, présentant les positions respectives des différentes Trichobilharzies. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

Les arbres phylogénétiques en NJ, ML et MP du domaine D2, enracinés sur *S. mansoni* montrent *Bilharziella polonica* comme groupe frère d'un clade incluant les différentes espèces de Trichobilharzies. Les deux échantillons (FOPS1 et FOPS2) correspondent aux deux haplotypes

obtenus à partir des furcocercercaires émises par les deux *Planorbarius corneus* au cours de notre étude. Le genre *Trichobilharzia* est divisé en plusieurs branches composées de *Trichobilharzia szidati*, *Trichobilharzia franki*, *Trichobilharzia regenti* et de deux branches formées par les *Trichobilharzia* sp.1 et sp.2. Ces branches sont bien soutenues par les valeurs de bootstraps. Il existe 14 sites de variations intra-génériques en D2 au sein du genre *Trichobilharzia*.

Pour le groupe *T. szidati*, les haplotypes FOLS8 et FOLS11 sont homologues à 100% aux séquences de FOLS1 et FOLS4 (déposées en ITS1 dans GenBank comme étant *Trichobilharzia szidati*), l'ensemble formant un groupe frère de *Trichobilharzia* sp.2 retrouvé à Annecy. Pour le groupe *T. regenti*, les séquences des cercaires isolées en France sont identiques à la séquence de *T. regenti* isolée en République Tchèque sur *Radix peregra*. Dans le groupe *T. franki*, les séquences de cercaires isolées sur le site du lac d'Annecy (à l'exception de EAN77) possèdent 3 variations par rapport aux cercaires de *Trichobilharzia franki* isolées sur les sites du lac du Der-Chantecoq, Strasbourg et Beauvais (cf 3.2.3). Enfin, les cercaires isolées en France à partir de *Planorbarius corneus* possèdent un haplotype identique à celui de *Bilharziella polonica* déposé dans GenBank.

3.2.2.1.2. Analyse des espaces transcrits internes ITS-1 partiel et ITS-2

L'alignement du domaine ITS-1 complet étant difficile et souvent aléatoire par la présence de domaines répétés, seules les premières bases « conservées » de l'espace transcrit interne ITS-1 associées à l'ITS-2 ont été utilisées lors des analyses phylogénétiques, conformément à ce qui a été préconisé par d'autres auteurs (Rudolfová *et al.*, 2005). Les séquences proposées par Picard et Jousson (2001) ont été exclues de l'étude, le domaine ITS-2 étant absent et le domaine ITS-1 incomplet.

L'alignement final comprend 35 taxons et sa taille est de 906 paires de bases, incluant les zones de délétions. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle General Time Reversible (GTR) avec une correction Γ (=0.3710). La fréquence des bases est F(A) = 0.2318 ; F(C) = 0.2088 ; F(G) = 0.2524 et F(T) = 0.3070. La proportion de sites invariables est nulle et 101 sites sont informatifs pour la recherche de l'arbre le plus parcimonieux. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 15).

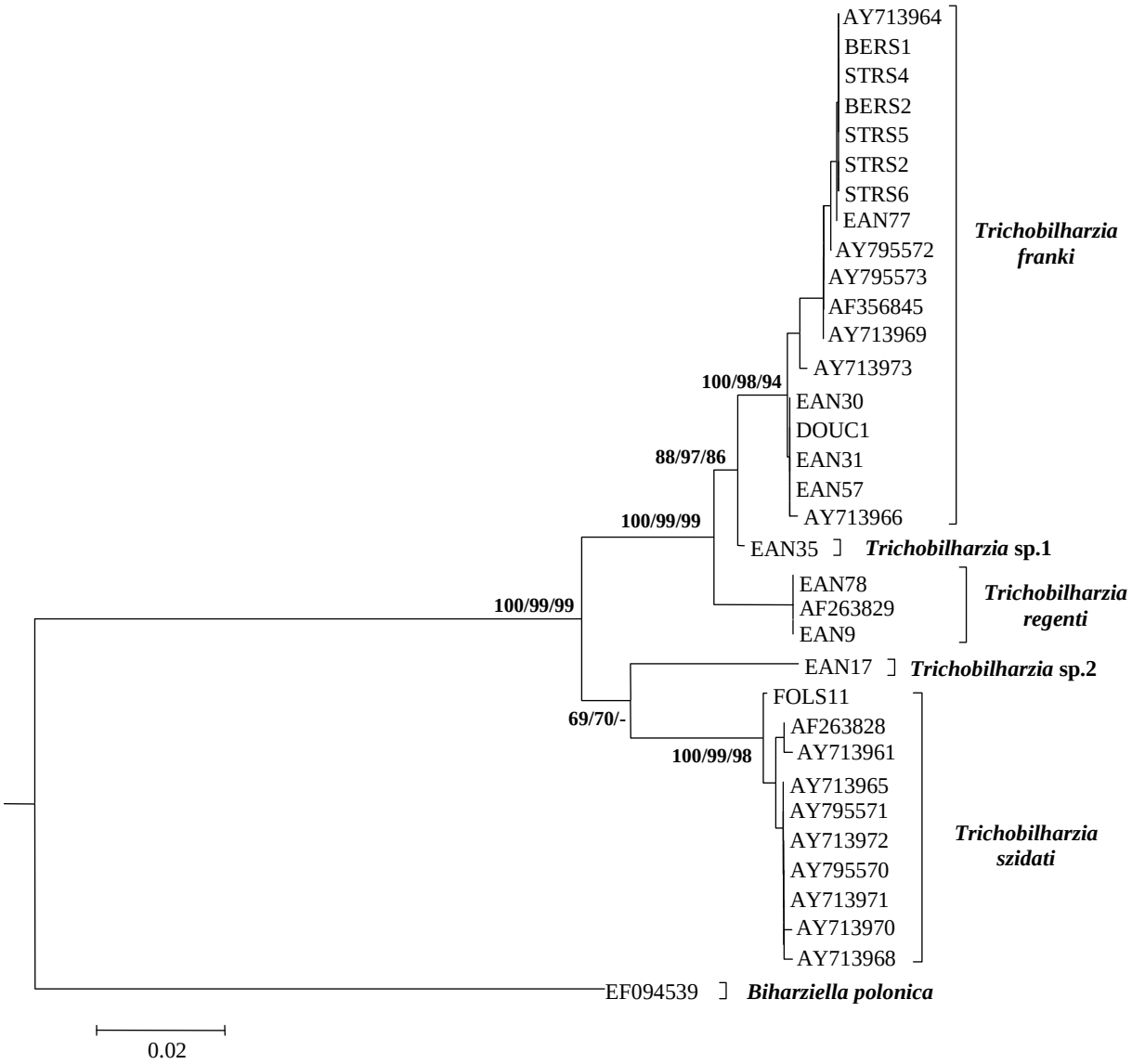


Figure 15 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance des domaines ITS-1 partiel et ITS-2 des différentes Furcocercaires ocellées, présentant les positions respectives des différentes Trichobilharzies. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

Les analyses ont montré 90 sites variables entre les séquences des différentes Trichobilharzies. Les différentes branches correspondant aux différentes espèces de Trichobilharzies sont soutenues par les valeurs de bootstraps obtenues lors des analyses.

Pour les haplotypes EAN9 et EAN78 (correspondant aux séquences de cercaires déposées dans GenBank pour des domaines différents), ces derniers sont 100% homologues avec celui de *Trichobilharzia regenti* (AF263829).

Dans le groupe de *T. franki*, 8 sites de variations infra-spécifiques existent. Les haplotypes correspondant aux cercaires isolées sur *Radix auricularia* présentent 7 variations avec les haplotypes des cercaires isolées sur *Radix peregra* et 6 variations avec celles isolées sur *Lymnaea*

stagnalis, formant ainsi 3 branches différentes en fonction du mollusque hôte. Seul l'haplotype AY713966 correspondant à une cercaire isolée sur *R. auricularia* en Pologne fait exception en se plaçant dans le groupe des cercaires provenant de *Radix peregra*.

Enfin, les séquences des cercaires isolées sur *Lymnaea stagnalis* se placent dans la branche des *Trichobilharzia szidati* déposés dans GenBank. Au sein de ce groupe, 8 variations infra-spécifiques sont présentes, avec la plus forte variabilité pour FOLS11 (3 variations).

Enfin, l'association des données obtenues pour le domaine ITS-1 partiel confirme la présence de deux nouveaux haplotypes (EAN17/81 et EAN35) différents des haplotypes de Trichobilharzies trouvées en Europe.

3.2.3. Cas particulier des cercaires de *Trichobilharzia franki*

Afin de mieux comprendre les différents résultats obtenus pour les cercaires de *T. franki*, nous avons étudié les différents haplotypes et leurs variations intra-spécifiques en fonction des 3 domaines D2, ITS-2 et ITS-1 considérés séparément (Figure 16).

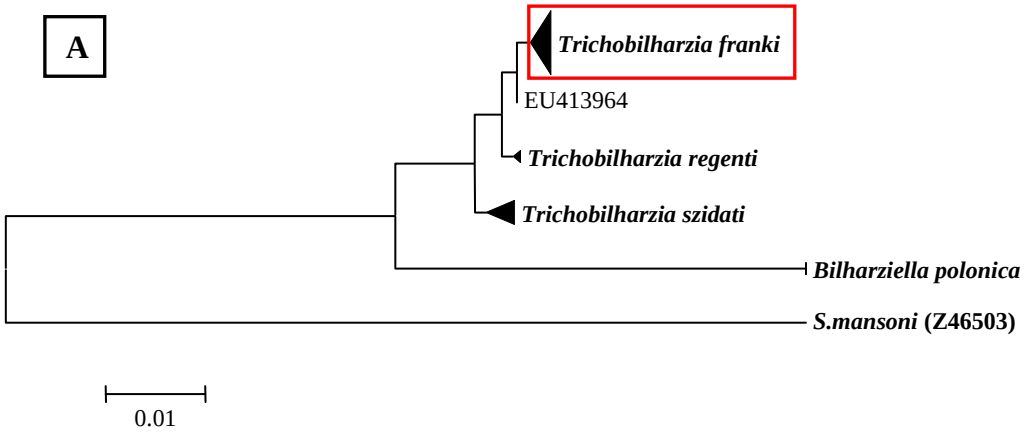
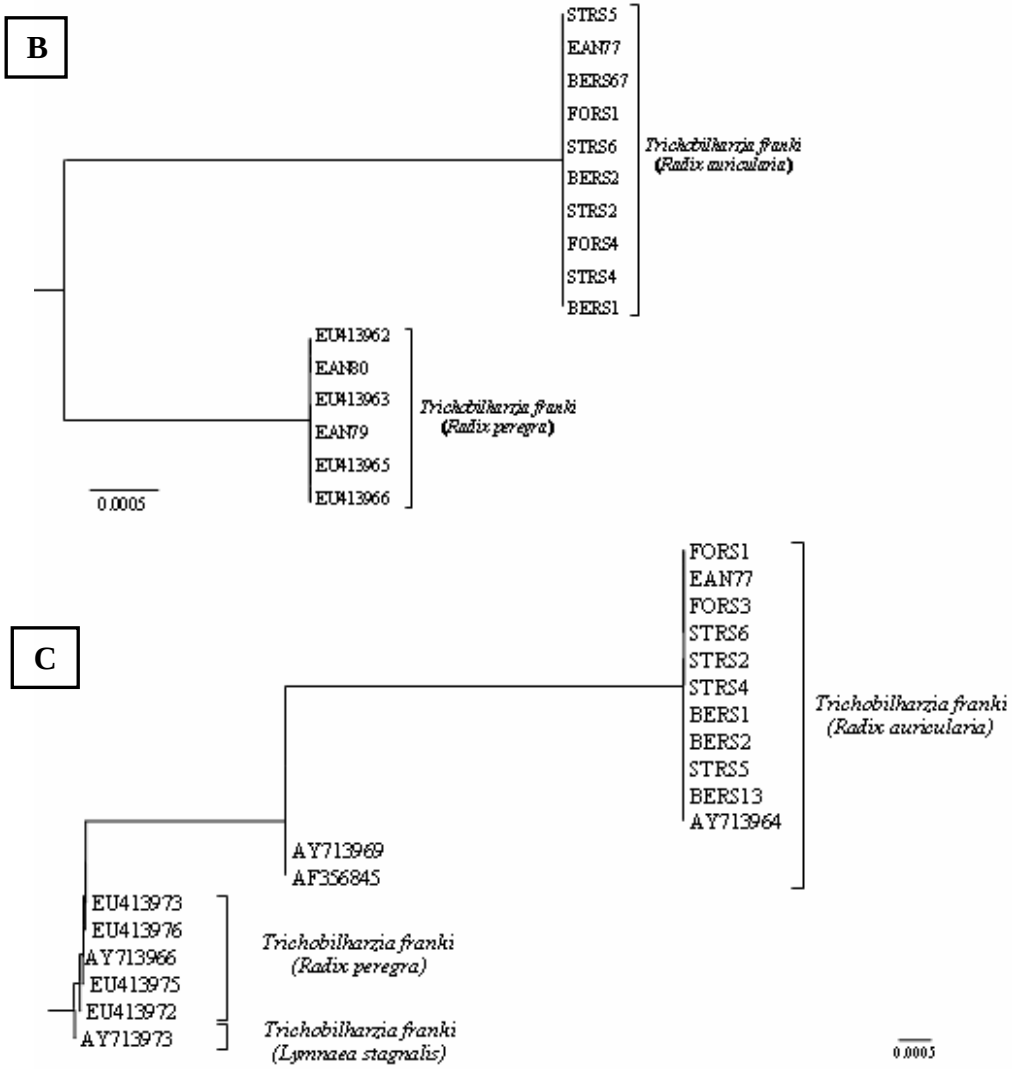
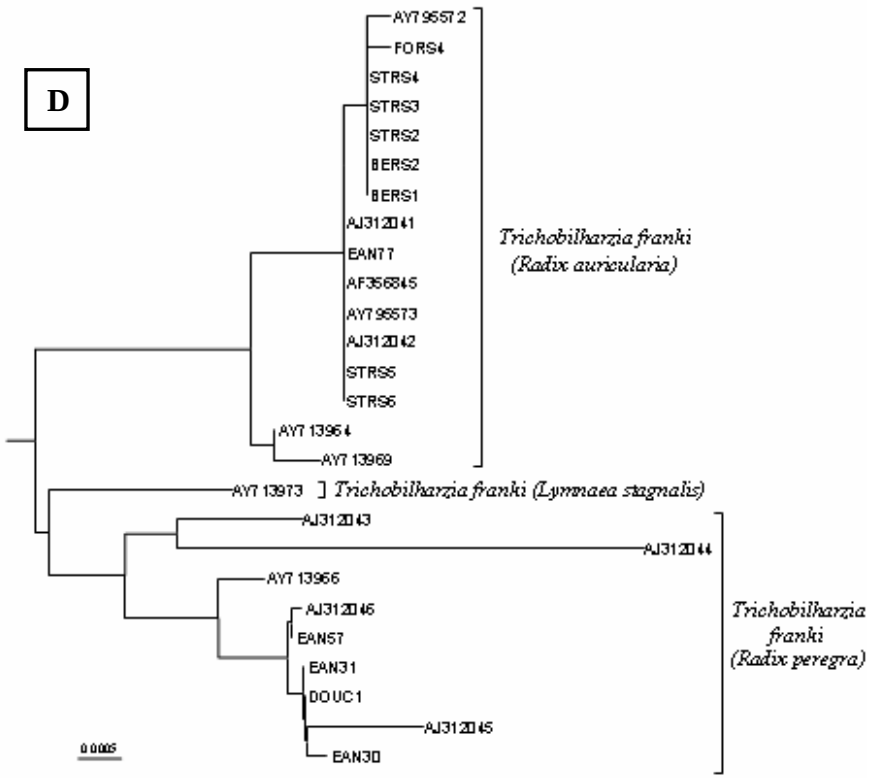


Figure 16 : A. Arbre phylogénétique général en Maximum de Vraisemblance présentant les positions respectives des différentes Trichobilharzies. B, C, D : Branches correspondant aux différentes Furcocercaires ocellées de *T. franki* pour B. le domaine D2 ; C. le domaine ITS-2 ; D. le domaine ITS-1 borné sur les séquences de Picard et Jousson, 2001. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement.


B
STRS5
EAN77
BERS67
FORS1
STRS6
BERS2
STRS2
FORS4
STRS4
BERS1
Trichobilharzia franki
(Radix auricularia)
EU413962
EAN80
EU413963
EAN79
EU413965
EU413966
Trichobilharzia franki
(Radix peregra)
0.0005
C
FORS1
EAN77
FORS3
STRS6
STRS2
STRS4
BERS1
BERS2
STRS5
BERS13
AY713964
Trichobilharzia franki
(Radix auricularia)
AY713969
AF356845
EU413973
EU413976
AY713966
EU413975
EU413972
AY713973
Trichobilharzia franki
(Radix peregra)
Trichobilharzia franki
(Lymnaea stagnalis)
0.0005


D
AY795572
FORS4
STRS4
STRS3
STRS2
BERS2
BERS1
AJ312041
EAN77
AF356845
AY795573
AJ312042
STRS5
STRS6
AY713964
AY713969
Trichobilharzia franki
(Radix auricularia)
AY713973
Trichobilharzia franki (Lymnaea stagnalis)
AJ312043
AJ312044
AY713966
AJ312046
EAN57
EAN31
DOUC1
AJ312045
EAN30
Trichobilharzia
franki
(Radix peregra)
0.0005

L'analyse des séquences des furcocercaires ocellées appartenant au groupe des *T. franki* montre la présence de deux haplotypes différents liés à l'hôte intermédiaire chez lequel ces cercaires ont été isolées. En effet, les haplotypes de celles isolées sur *R. peregra / ovata* présentent des variations intra-spécifiques identiques en D2 et ITS-2, ainsi qu'en ITS-1, différant ainsi de ceux des cercaires isolées sur *Radix auricularia*.

En D2 et ITS-2, les séquences des cercaires isolées sur *Radix peregra* provenant du lac d'Annecy possèdent 3 variations par rapport aux cercaires de *Trichobilharzia franki* isolées sur les sites du lac du Der-Chantecoq, Strasbourg et Beauvais, ainsi que de celles sur *Radix auricularia* en Pologne. De plus, une cercaire récemment isolée à Annecy sur *Radix auricularia* (EAN77) possède le même haplotype que celui des cercaires isolées chez cette espèce.

Enfin, pour le domaine ITS-1 et malgré la grande variabilité de celui-ci, ce phénomène de spécificité haplotypique liée à l'hôte est également observé, avec notamment la présence d'une inclusion nucléotidique de 25 paires de bases pour les cercaires isolées chez *R. peregra / ovata* en France, mais aussi en Suisse, Pologne et République Tchèque. Seul l'haplotype AY713966 isolé sur *R. auricularia* en Pologne possède, en ITS-2 et ITS-1 les mêmes variations que celles des cercaires isolées sur *R. peregra*.

RÉSULTATS : Partie II

« Trichobilharzies » et hôtes définitifs

4.1. Prévalences

4.1.1. Chez les oiseaux du genre *Anas* (Tableau V)

Au niveau nasal, 108 Colverts (*Anas platyrhynchos*) (55%) sur les 196 étudiés ont été retrouvés positifs à des œufs et/ou miracidium et/ou des adultes de Trichobilharzies. Au niveau viscéral, sur les 33 Colverts analysés, 18 se sont avérés positifs (54%), dont 5 en co-infestation avec *Bilharziella polonica*.

Chez les Sarcelles d'hiver (*Anas crecca*), aucun parasite nasal n'a été retrouvé. Au niveau viscéral, seules 2 Sarcelles (13%) sur les 15 autopsiées étaient positives par mise en évidence d'œufs ou d'adultes de Trichobilharzies. Dans les 2 cas, une co-infestation Trichobilharzies / *B. polonica* fut observée.

Sur les 5 Souchets (*Anas clypeata*) analysés au niveau nasal, 2 étaient positifs aux Trichobilharzies. De même, 2 Souchets étaient positifs sur 5 autopsiés au niveau viscéral, dont l'un présentant une co-infestation avec *B. polonica*.

Enfin, aucun schistosome aviaire ne fut retrouvé sur chipeau (*Anas strepera*) ou pilet (*Anas acuta*).

Tableau V : Prévalences observées chez les espèces hôtes du genre *Anas*

Espèce Hôte		**Origine**	**Nasal**	**Viscéral**
			Testés/+	**Testés/+**
Colvert	*A. platyrhynchos*	Champagne-Ardenne	72 / **25**	23 / **12**
		Beauvais	18 / **9**	5 / **5**
		Annecy	106 / **74**	5 / **1**
Sarcelle d'hiver	*A. crecca*	Champagne-Ardenne	22 / 0	15 / **2**
Chipeau	*A. strepera*	Champagne-Ardenne	3 / 0	1 / 0
Souchet	*A. clypeata*	Champagne-Ardenne	5 / **2**	5 / **2**
Pilet	*A. acuta*	Champagne-Ardenne	3 / 0	2 / 0

4.1.2. Chez les autres Ansériformes

Des Trichobilharzies nasales ont été retrouvées chez 13 (33%) Cygnes tuberculés (*Cygnus olor*), 3 Fuligules morillons (*Aythya fuligula*), 1 Fuligule milouin (*Aythya ferina*) et 1 Harle bièvre (*Mergus merganser*). Aucun parasite nasal ne fut retrouvé chez les Oies cendrées (*Anser anser*).

6 Cygnes tuberculés (*Cygnus olor*), 6 Oies cendrées (*Anser anser*) et 1 Fuligule morillon (*Aythya fuligula*) présentaient des Trichobilharzies au niveau viscéral. Aucun Fuligule milouin

(*Aythya ferina*) ni Harle bièvre (*Mergus merganser*) ne fut retrouvé positif au niveau des viscères (Tableau VI). Sur les 6 Cygnes positifs, 4 hébergeaient également *Bilharziella polonica* et parmi eux, deux présentaient également une infestation à *Dendritobilharzia pulverulenta*.

Tableau VI : Origines des prélèvements et prévalences observées des Trichobilharzies nasales et viscérales chez les Ansériformes

Espèce	Nom latin	Origine	Nasal	Viscéral
			Testés/+	Testés/+
Cygne tuberculé	*Cygnus olor*	Champagne-Ardenne	29 / **5**	11 / **6**
		Savoies- Haute Savoies	10 / **8**	1 / 0
Oie cendrée	*Anser anser*	Champagne-Ardenne	9 / 0	11 / **6**
Fuligule morillon	*Aythya fuligula*	Champagne-Ardenne	2 / **1**	1 / **1**
		Annecy	4 / **2**	NC
Fuligule milouin	*Aythya ferina*	Champagne-Ardenne	4 / 0	2 / 0
		Annecy	7 / **1**	NC
Harle bièvre	*Mergus merganser*	Annecy	1/**1**	NC

NC : non calculé (< 10 exemplaires)

4.1.3. Chez les autres oiseaux aquatiques

Les oiseaux aquatiques autres que les Ansériformes ne présentaient aucun parasite de type Trichobilharzie au niveau viscéral et nasal. Les animaux analysés et leurs effectifs correspondants sont les suivants : 3 Foulques macroules (*Fulica atra*) ; 3 poules d'eau (*Gallinula chloropus*) ; 2 grèbes huppés (*Podiceps cristatus*) ; 4 Hérons cendrés (*Ardea cinerea*); 9 grands Cormorans (*Phalacrocorax carbo*) et 3 Grues cendrées (*Grus grus*). Les faibles effectifs étudiés ne nous ont pas permis d'éliminer l'éventualité pour ces oiseaux d'être hôtes définitifs.

4.2. Diversité haplotypique des Trichobilharzies viscérales

4.2.1. Chez les oiseaux aquatiques

Les références de nos échantillons et de ceux utilisés pour l'analyse sont regroupées sous la forme du Tableau VII.

Tableau VII : Récapitulatif des références correspondant aux échantillons utilisés

Espèce	Hôte	Stade	Localisation	Localité	Référence BM
Trichobilharzia franki	Colvert	adulte	foie	Der-Chantecoq	FRA12
		œuf	caecum	Der-Chantecoq	FRA15, FRA20
		œuf	intestin	Vanault les Dames	KAL2
		adulte	foie	Vanault les Dames	KAL36
		adulte	foie	Beauvais	BERS26
	Fuligule morillon	adulte	foie	Der-Chantecoq	MORI11
	Sarcelle d'hiver	adulte	foie	Der-Chantecoq	SAR21
		adulte	foie	Forêt d'Orient	JER1
	Cygne tuberculé	adulte	foie	Der-Chantecoq	CYG12
Trichobilharzia szidati	Sarcelle d'hiver	œuf	intestin	Der-Chantecoq	SAR17
		oeuf	x	Pologne	EF094530
	Souchet	œuf	intestin	Vanault les Dames	KAL49
	Colvert	oeuf	x	Pologne	EF094536
		adulte	x	Rép. Tchèque	EF094541
Trichobilharzia sp.	Siffleur	oeufs	x	Pologne	EF094531-32

4.2.1.1. *Trichobilharzia franki* et hôtes définitifs

Les œufs et/ou adultes de *Trichobilharzia franki* ont été isolés sur 4 espèces d'oiseaux aquatiques. Des fragments d'adultes ont été isolés au niveau hépatique chez le Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) ; des œufs et des fragments d'adultes chez le Colvert (*Anas platyrhynchos*) au niveau caecal et hépatique respectivement ; des fragments d'adultes au niveau hépatique chez la Sarcelle d'hiver (*Anas crecca*) et enfin des fragments d'adultes au niveau du foie du Fuligule morillon (*Aythya fuligula*). Aucune séquence de *Trichobilharzia franki* isolée sur hôte définitif n'étant disponible dans GenBank, seules les séquences obtenues lors de notre étude ont été analysées. Afin de pouvoir effectuer une comparaison, deux séquences de cercaires de *T. franki* isolées sur *R. peregra* (EU413962) et *R. auricularia* (FORS1) ont été ajoutées aux différentes analyses.

4.2.1.1.1. Analyse du domaine D2

L'alignement final comprend 15 taxons et sa taille est de 554 paires de bases, incluant les zones de délétions. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985) avec une correction Γ (=0.5587). La fréquence des bases est F(A) = 0.1621 ; F(C) = 0.1939 ; F(G) = 0.3175 et F(T) = 0.3265. Le taux de transitions / transversions est de 3.1677, la proportion de sites invariables est nulle. Le nombre de sites informatifs pour l'analyse en Parcimonie est de 17. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 17).

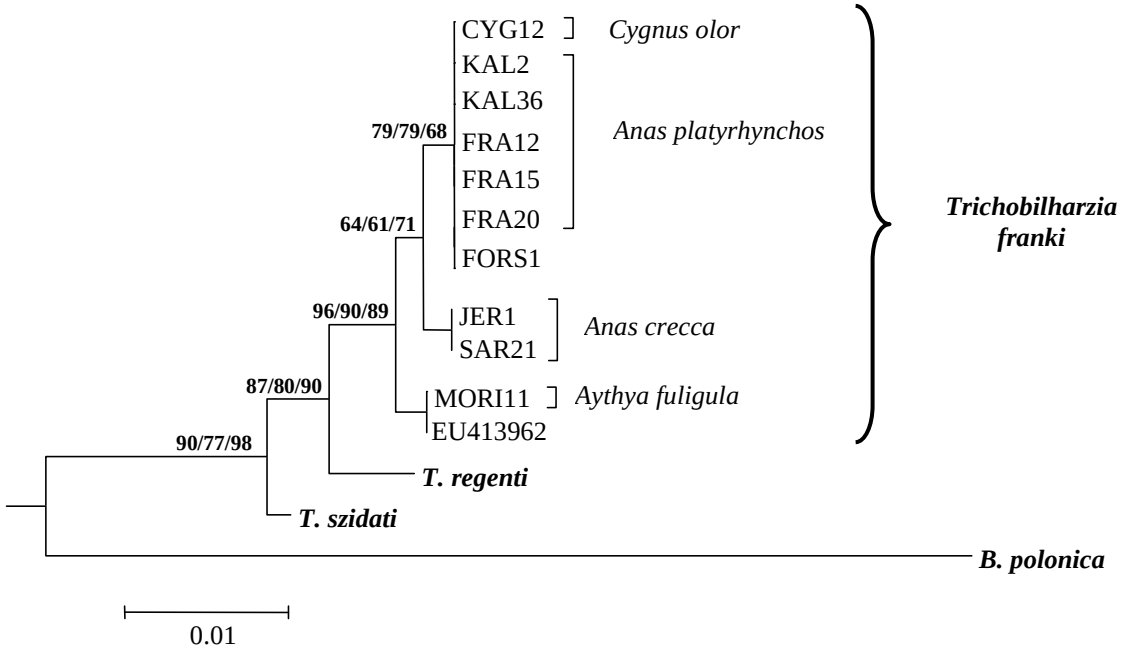


Figure 17 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance du domaine D2 des différents exemplaires de *T. franki*. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en NJ, ML et MP.

Sur les 554 paires de bases, 4 variations intra-spécifiques sont présentes entre les différents haplotypes de *T. franki*. Les séquences des œufs et adultes isolés chez le Colvert (*A. platyrhynchos*) et le Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) possèdent une homologie de 100% entre elles et avec la séquence de *T. franki* isolée sur *Radix auricularia*.

Un seul haplotype correspond aux différentes séquences provenant des échantillons sur Sarcelle d'hiver. Celui-ci diffère en D2 par 2 bases nucléotidiques avec les autres séquences de *T. franki*. Enfin, l'échantillon isolé sur le Fuligule morillon (*A. fuligula*), provenant du lac du Der, présente un haplotype identique à celui des cercaires de *T. franki* isolées sur *Radix peregra* à Annecy. Les variations intra-spécifiques observées pour le domaine D2 sont représentées sur la Figure 18.

		259	288	360	414
Anas platyrhynchos	FRA12	T	A	C	T
	FRA15	•	•	•	•
	FRA20	•	•	•	•
	KAL2	•	•	•	•
	KAL36	•	•	•	•
Cygnus olor	CYG12	•	•	•	•
Anas crecca	JER1	•	T	•	C
	SAR21	•	T	•	C
Aythya fuligula	MORI11	C	•	T	C

Figure 18 : Alignement des séquences partielles du domaine D2 des *T. franki* retrouvés chez les hôtes définitifs, représentant les variations entre les différents haplotypes. Les bases identiques sont représentées par un point (•). Seuls les sites variables avec leur position donnée au-dessus sont présentés.

4.2.1.1.2. Analyse des ITS-2 et ITS-1

Pour le domaine ITS-2, l'alignement final comprend 14 taxons et sa taille est de 346 paires de bases, incluant les zones de délétions. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985) avec une correction Γ (=0.3108). La fréquence des bases est F(A) = 0.2466 ; F(C) = 0.1909 ; F(G) = 0.2361 et F(T) = 0.3265. Le taux de transitions / transversions est de 2.3894, la proportion de sites invariables est nulle. Le nombre de sites informatifs pour l'analyse en Parcimonie est de 23. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 19).

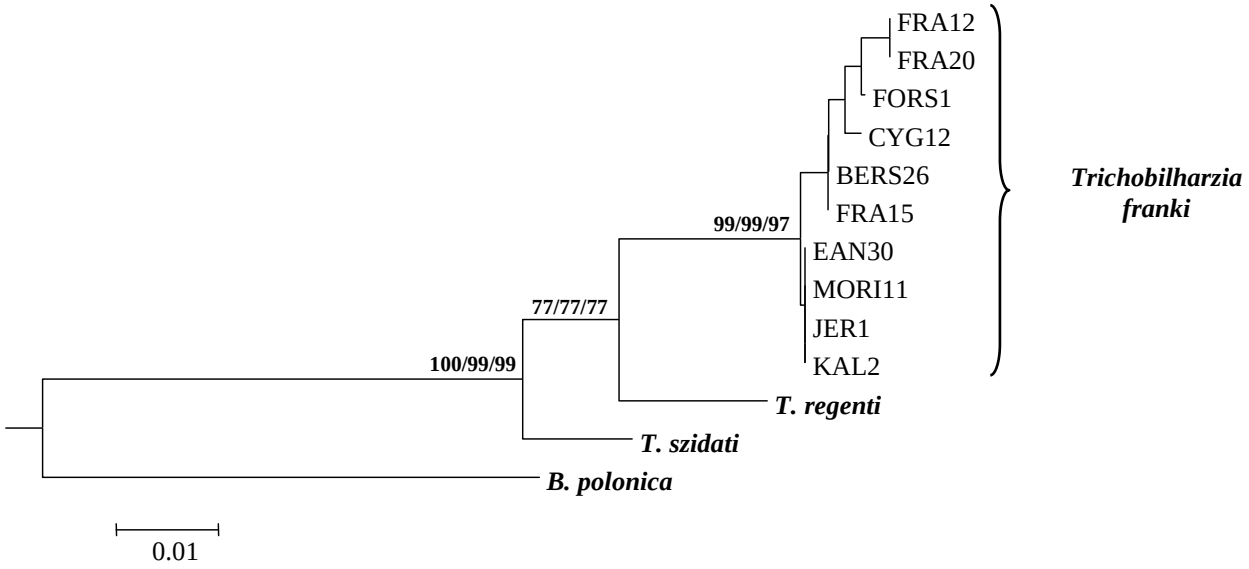


Figure 19 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance du domaine ITS-2 des différents œufs et adultes de *T. franki*, présentant les positions respectives des différentes Trichobilharzies. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

En ITS-2, il existe 3 variations intra-spécifiques entre les différents haplotypes de *T. franki*. Toutefois, aucune correspondance n'existe entre les variations observées et l'origine des prélèvements. Ceci tend à montrer le caractère spécifique, et non populationnel de ce domaine.

Pour l'ITS-1, l'alignement étant rendu difficile du fait de zones dites répétées, seules les séquences de *Trichobilharzia franki* ainsi que les séquences des taxons utilisés pour l'enracinement ont été conservées. L'alignement final comprend 10 taxons et sa taille est de 1691 paires de bases, incluant les zones de délétions. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985). La fréquence des bases est F(A) = 0.2688 ; F(C) = 0.1893 ; F(G) = 0.2730 et F(T) = 0.2690. Le taux de transitions / transversions est de 1.6416, la proportion de sites invariables est nulle. 104 sites sont informatifs

pour l'analyse en Parcimonie. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 20).

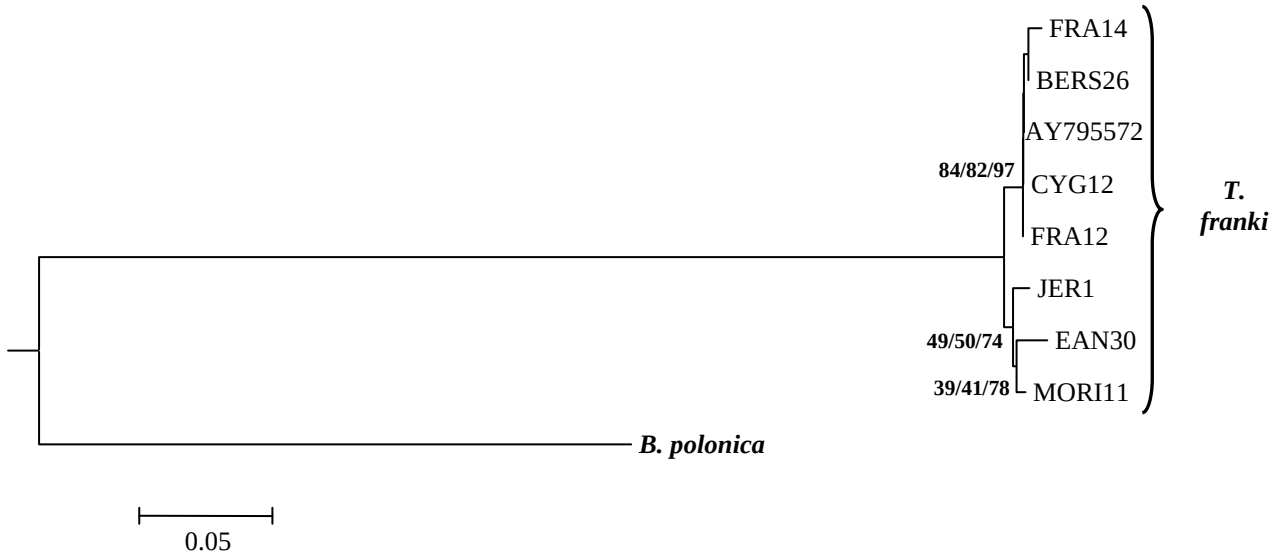


Figure 20 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance du domaine ITS-1 des différents œufs et adultes de *T. franki*, présentant les positions respectives des différents haplotypes. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

54 variations intra-spécifiques sont présentes entre les différents haplotypes de *T. franki*. En plus de ces variations, les séquences JER1 et MORI11, correspondant à des fragments d'adultes isolés respectivement chez la Sarcelle d'hiver (*A. crecca*) et le Fuligule morillon (*Aythya fuligula*), présentent une inclusion de 25 paires de bases, partagée également par les cercaires de *T. franki* isolées sur *Radix peregra*, mais absente chez les Colverts, Cygnes et cercaires de *T. franki* isolées sur *R. auricularia*.

4.2.1.2. *Trichobilharzia szidati* et hôtes définitifs

Des œufs de *Trichobilharzia szidati* ont été isolés au niveau intestinal sur 3 espèces d'oiseaux aquatiques provenant tous de la région Champagne-Ardenne : chez le Colvert (*Anas platyrhynchos*); chez la Sarcelle d'hiver (*Anas crecca*) et enfin chez le Souchet (*Anas clypeata*). Tous les œufs isolés étaient inclus au niveau de la muqueuse intestinale. Pour l'alignement, seules les séquences des œufs isolés sur Sarcelle et sur Souchet ont été utilisées, l'amplification des œufs issus du Colvert ayant échouée (Figure 21).

Figure 21 : Œufs de *Trichobilharzia szidati* (ou supposés) isolés au niveau intestinal chez le Souchet (*A. clypeata*) (**A**) et chez le Colvert (*A. platyrhynchos*) (**B**)

Les topologies des arbres en ITS2 et en D2 sont conGruentes. Aussi, seul l'arbre correspondant au domaine ITS-2 est représenté sur la Figure 22. Pour ce domaine, l'alignement final comprend 9 taxons et sa taille est de 343 paires de bases, incluant les zones de délétions. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985) avec une correction Γ (=0.4459). La fréquence des bases est F(A) = 0.2487 ; F(C) = 0.1894 ; F(G) = 0.2347 et F(T) = 0.3273. Le taux de transitions / transversions est de 1.7825, la proportion de sites invariables est nulle (Figure 22).

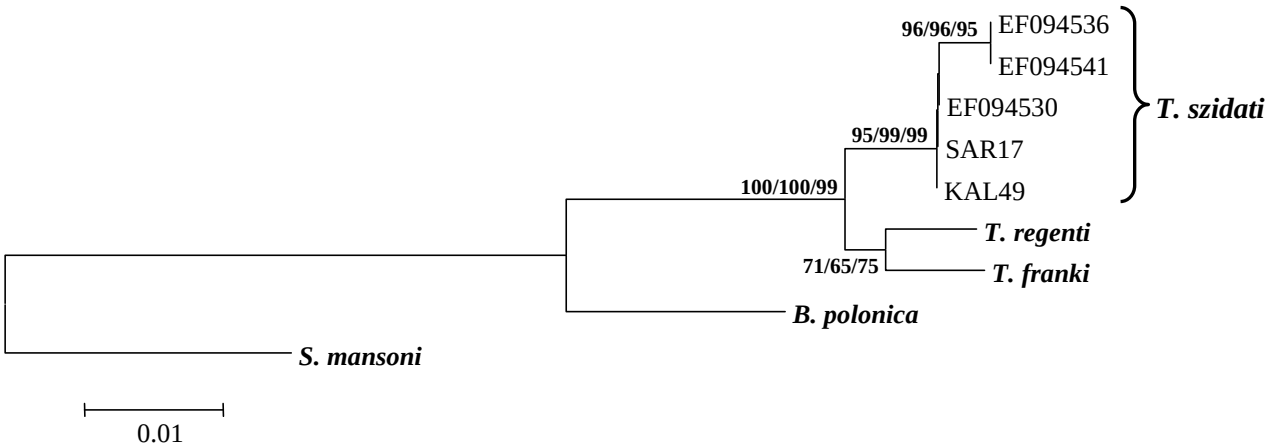


Figure 22 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance du domaine ITS-2 des différents œufs et adultes de *T. szidati*, présentant les positions respectives des différentes Trichobilharzies. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

L'alignement comprend 23 sites informatifs pour l'analyse en Parcimonie. Il comprend également 22 sites de variations inter-spécifiques pour le clade des Trichobilharzies et 3 sites de variations entre les différents haplotypes de *T. szidati*. La variabilité de ces 3 sites n'est présente que pour les séquences des œufs isolés chez le Colvert (EF094536 et EF094541) en Pologne et en République Tchèque. Les œufs isolés à partir des Sarcelles et du Souchet ont un haplotype identique quelque soit l'origine du prélèvement.

4.2.2. Schistosomes aviaires chez les Oies cendrées (*Anser anser*)

4.2.2.1. Origine du matériel et identification morphologique

L'étude des parasites des Oies a été effectuée à partir d'oiseaux isolés en France et en Islande. 11 Oies provenaient de la région Champagne-Ardenne : lac du Der-Chantecoq et environs de Montmirail. Aucun parasite nasal n'a été retrouvé. En revanche 6 Oies étaient positives vis-à-vis de Trichobilharzies viscérales. Les Oies en provenance d'Islande ont été analysées sur place (Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur, Laboratory of Parsasitology). Celles-ci provenaient de la région de Reykjavik et la prévalence observée jusqu'alors est de 66% (16+/24) (Skírnisson, communication personnelle). Les différents échantillons isolés sont rassemblés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Liste des échantillons isolés en France et en Islande sur *Anser anser*

Hôte	haplotype	Stade	Localisation	Localité	Référence BM
Anser anser	*Anser anser* Aa1.	œuf	caecum	Der-Chantecoq	ANS31
		adulte	intestin	Der-Chantecoq	ANS35
		adulte	caecum	Der-Chantecoq	ANS37
		adulte	caecum	Der-Chantecoq	ANS38
	Anser anser Aa2.	œuf	intestin	Der-Chantecoq	ANS9
		œuf	intestin	Der-Chantecoq	ANS17
		œuf	intestin	Der-Chantecoq	ANS18
		œuf	intestin	Tjörnin, Reykjavik	SKI5
		œuf	intestin	Tjörnin, Reykjavik	SKI8
	*Anser anser*Aa3.	œuf	intestin	Der-Chantecoq	ANS12
		œuf	intestin	Der-Chantecoq	ANS22
		œuf	intestin	Montmirail	ANS24
		œuf	caecum	Der-Chantecoq	ANS29
		œuf	caecum	Der-Chantecoq	ANS32
		adulte	intestin	Der-Chantecoq	ANS36
		adulte	caecum	Der-Chantecoq	ANS40
		œuf	caecum	Der-Chantecoq	ANS41
		œuf	intestin	Tjörnin, Reykjavik	SKI2
		œuf	intestin	Tjörnin, Reykjavik	SKI4
		adulte	intestin	Stekkjabakka, Reykjavik	SKI11

Lors des premières observations, deux espèces différentes ont été suspectées sur les critères morphologiques des œufs. Ces deux espèces étaient présentes en Islande et en France, et une espèce supplémentaire ne fut retrouvée que chez les Oies françaises. Ces différentes espèces étaient présentes soit seules, soit co-parasites chez le même hôte.

Dans un premier temps, la présence de deux types d'œufs (œufs fusiformes de type Trichobilharzie) a suggéré deux taxons différents du fait de leurs morphologies respectives : des œufs à 2 pointes de grande taille, d'une longueur de 250µm environ sur une largeur maximale de 60µm, et des œufs de petite taille de 138 µm de long sur 36µm de large (Figure 23).

Au niveau des adultes, des exemplaires de grande taille (mâles et femelles) et des exemplaires de petite taille (mâles et femelles) ont été isolés. Leurs caractères morphologiques semblables à ceux des Trichobilharzies nous ont, dans un premier temps, laissé supposer la correspondance avec les populations d'œufs citées précédemment.

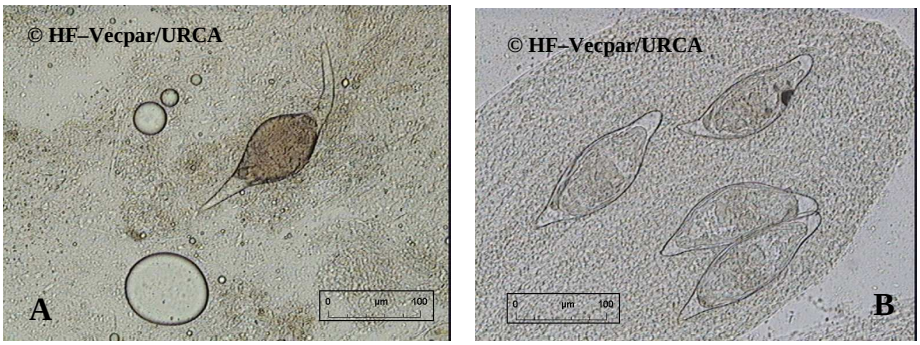


Figure 23 : Œufs de type Trichobilharzie retrouvés au niveau de la muqueuse intestinale des Oies cendrées (*Anser anser*) en France et en Islande; A : œufs « grande taille » ; B : œufs « petite taille »

Dans le même temps un troisième type d'œuf, morphologiquement très différent des autres (ovalaire et présence d'un petit appendice, ou éperon à l'une des extrémités) a été mis en évidence, évoquant la morphologie d'un œuf de type *Dendritobilharzia*. Ces œufs n'ont été isolés que sur des Oies retrouvées en France (Figure 24).

.

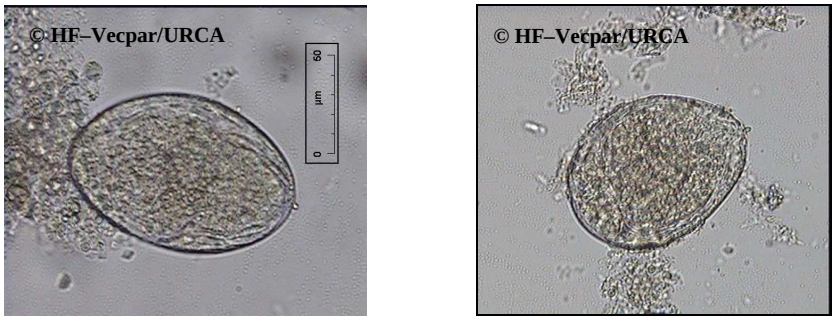


Figure 24 : Œufs de type « *Dendritobilharzia* » retrouvés en France au niveau de la muqueuse intestinale des l'Oies cendrée (*Anser anser*)

Les différents échantillons ont été analysés en biologie moléculaire afin d'associer les individus mâles et femelles d'une même espèce et reconnaître les œufs correspondant à ces derniers.

4.2.2.2. Analyses et résultats

Les résultats du séquençage des haplotypes pour chacun des groupes montrent des homologies à 100% aussi bien pour le D2 que pour l'ITS2.

Nous avons retenu l'ITS-2, car s'appuyant sur un plus grand nombre d'haplotypes et pour la simplicité d'alignement des séquences lorsque celles-ci sont nombreuses. Pour le domaine ITS-2, l'alignement final comprend 35 taxons et sa taille est de 359 paires de bases, incluant les zones de délétions. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985) avec une correction Γ (=0.3539). La fréquence des bases est F(A) = 0.2818 ; F(C) = 0.1787 ; F(G) = 0.2036 et F(T) = 0.3359. Le taux de transitions / transversions est de 1.4625, la proportion de sites invariables est nulle. 83 sites sont informatifs en Parcimonie. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 25).

Les analyses phylogénétiques confirment la présence de 3 nouvelles « espèces », *Anser anser* Aa1, Aa2, Aa3, par l'identification de 3 haplotypes ne correspondant pas aux couples supposés mis en évidence sur leurs traits morphologiques.

En ITS-2, les haplotypes de Aa3 diffèrent par 8 sites de ceux de *T. szidati*, par 15 sites de ceux de *T. regenti*, par 21 sites de ceux de *T. franki* et par 14 sites de ceux de *Trichobilharzia* sp. (taxons définis par Rudolfová *et al.*, 2007). L'haplotype Aa1 n'appartient à aucun genre préalablement décrit. Il diffère de la séquence d'*Allobilharzia visceralis* par 26 variations inter-spécifiques, et de *T. szidati* par 22 variations. Enfin, l'haplotype Aa2 se présente comme groupe frère de *Gigantobilharzia huronensis* sur la base de 20 sites nucléotidiques. Il diffère également de *Dendritobilharzia pulverulenta* par 21 variations.

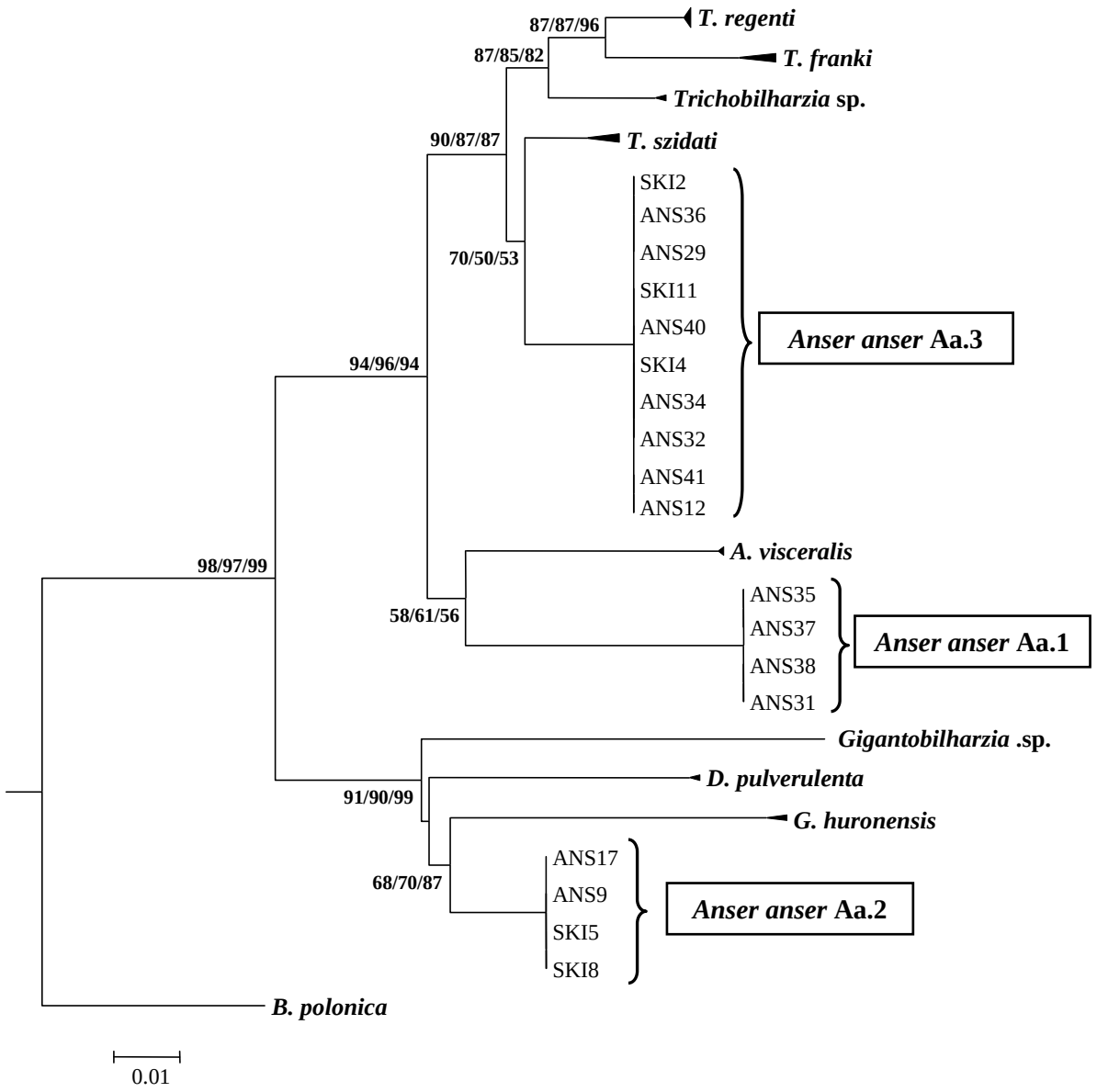


Figure 25 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance du domaine ITS-2 des différents œufs et adultes retrouvés chez *Anser anser*, présentant les positions respectives des différents genres de Schistosomes aviaires. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

4.3. Etude d'une Trichobilharzie nasale : exemple de *T. regenti*

4.3.1. Polymorphisme morphologique des œufs

Les œufs ont été retrouvés libres dans le liquide de perfusion des cornets ou inclus dans des lésions au niveau de la muqueuse nasale. Lors de leur isolement, les œufs ont été photographiés et mesurés. Par un examen microscopique nous avons observé un polymorphisme en fonction de l'espèce hôte mais aussi pour des exemplaires issus d'hôtes différents appartenant à la même espèce

(Figure 26A et 26B). Chez le Colvert (*A. platyrhynchos*), les oeufs fusiformes sont pourvus d'une épine terminale et mesurent 290 ±21 x 68 ±9 µm. Chez le Cygne tuberculé, les œufs sont plus longs mais moins larges (338 x 52 µm). C'est principalement chez le Souchet (*A. clypeata*) que les critères de taille et de forme sont considérablement différents : œuf plus court, en forme de boomerang ou de chapeau bicorne, d'une longueur de 259 (±17) µm sur une largeur de 62 (±6) µm.

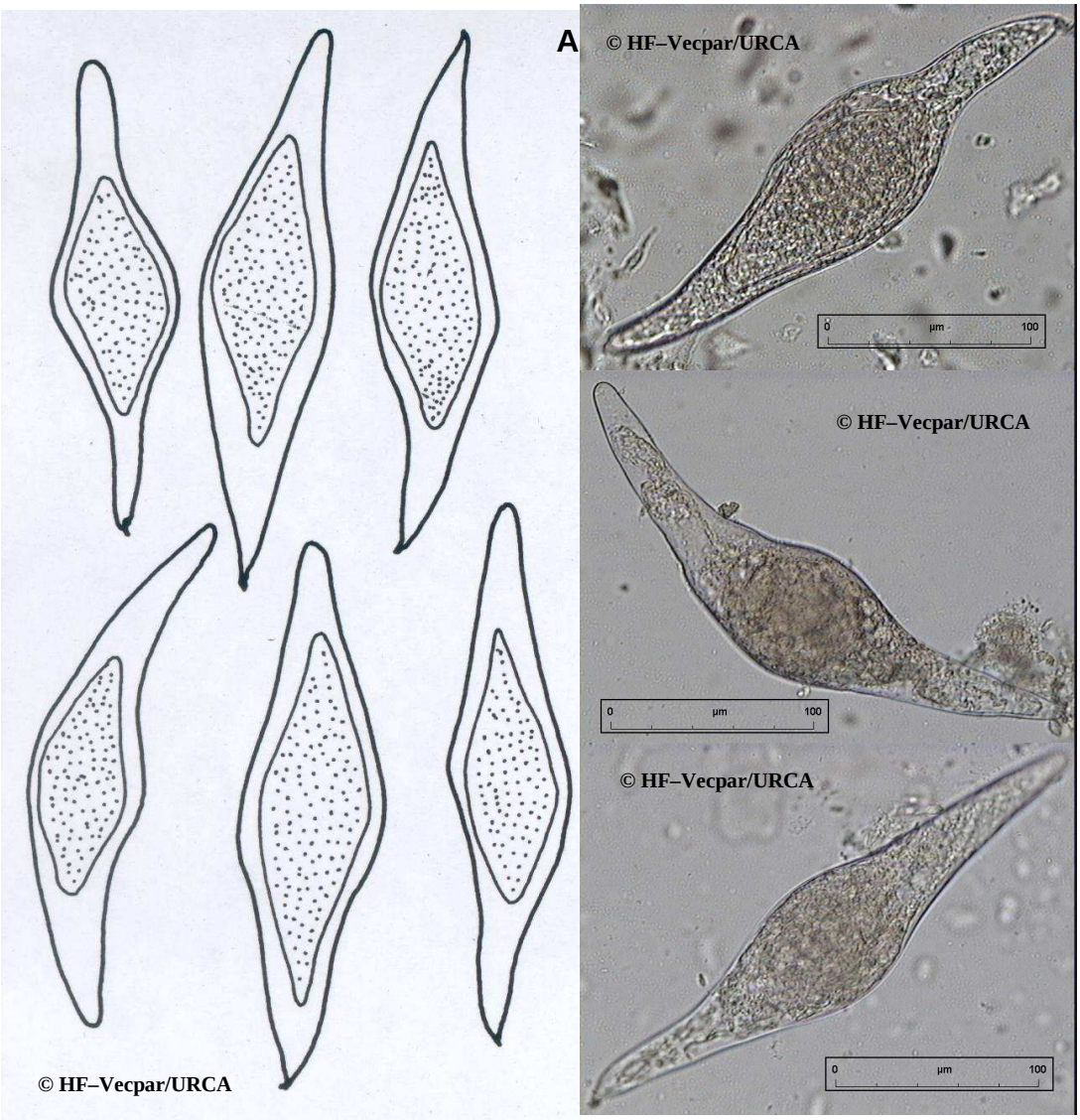


Figure26A

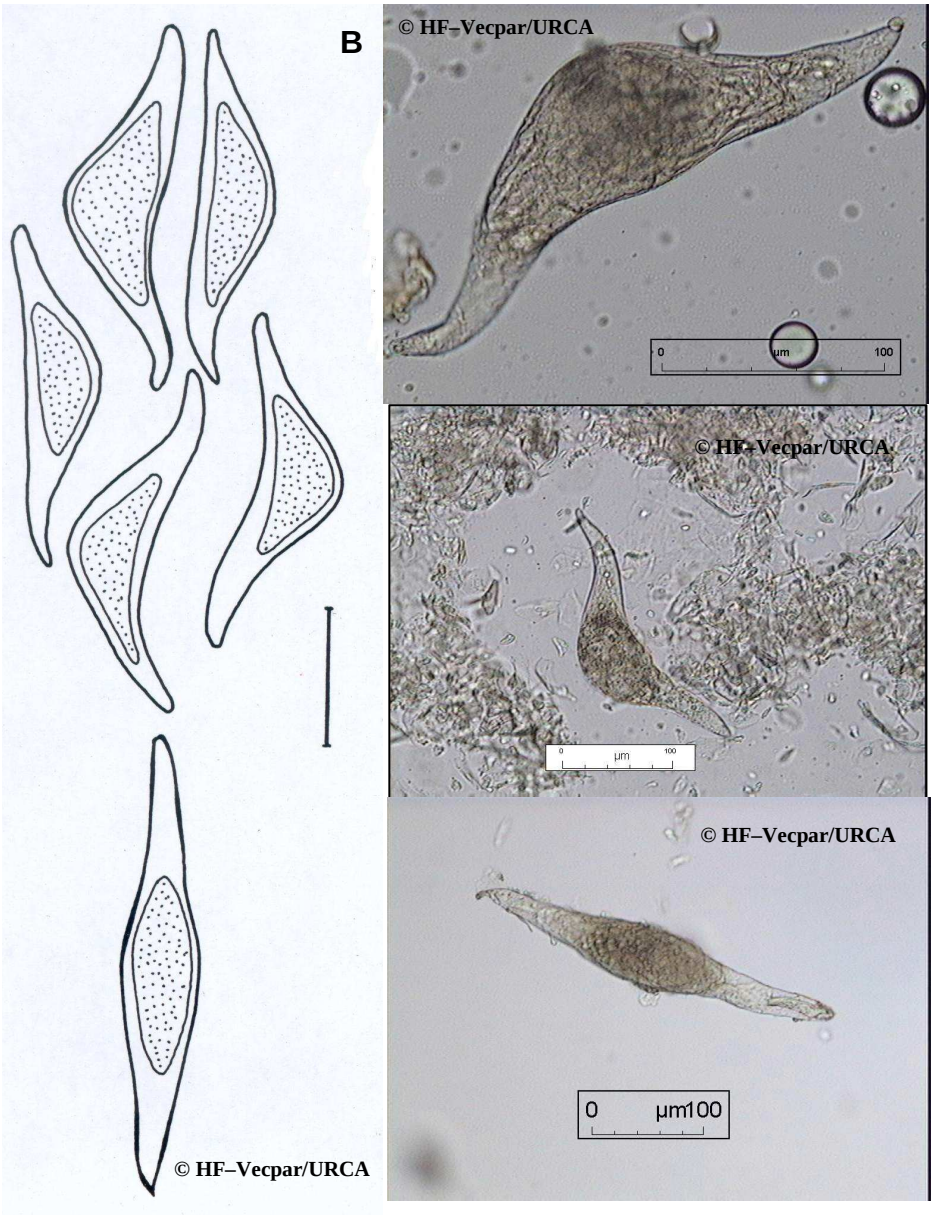


Figure 26 : Œufs de type Trichobilharzie isolés au niveau de la muqueuse nasale de différents oiseaux aquatiques en France. **A**. *A. platyrhynchos* ; **B**. *A. clypeata* et *Cygnus olor*

4.3.2. Polymorphisme haplotypique

Les parasites retrouvés au niveau nasal ayant fait l'objet d'une extraction et d'une amplification d'ADN sont présentés dans le Tableau IX, ainsi que les séquences enregistrées dans GenBank.

Tableau IX : Origines des échantillons de Trichobilharzies nasales isolés au laboratoire chez les différents oiseaux aquatiques.

Espèce hôte	Stade	Localité	Référence BM
Colvert (*Anas platyrhynchos*)	œuf, miracidium	Annecy	CAN1, CAN3, CAN5
	Œuf	Vouziers	FOS1
	Œuf	Aisne	JA3
	miracidium	Der-chantecoq	FRA19
	Adulte	Vouziers	7AD1
	Œuf	Der-chantecoq	COLD2
	œuf et adulte	Vouziers	PAY1, PAY3
	Œuf	Beauvais	BERS55, BERS58
	Adulte	Beauvais	BERS52, BERS66
Harle bièvre (*Mergus merganser*)	Œuf	Annecy	HAR1
	Adulte	Annecy	HAR11
Cygne tuberculé (*Cygnus olor*)	Œuf	Der-chantecoq	NOLO1, NOLO3
	Œuf	Annecy	CYA3, 10, 18, 23, 28, 37, 40
	Œuf	Der-chantecoq	CYD1, CYD11
Souchet (*Anas clypeata*)	Œuf	Marne	SOU2, SOU3, JIT10, JIT11
Séquences disponibles (GenBank)			
Souchet (*Anas clypeata*)	oeufs	Pologne	EF094533
	oeuf/miracidium	Rép. Tchèque	EF094540
Fuligule morillon (*Aythya fuligula*)	Œufs	Pologne	EF094534
Colvert (*A. platyrhynchos*)	oeufs	Pologne	EF094535
	oeufs/adulte	Pologne	EF094537
	oeuf/miracidium	Rép. Tchèque	EF094538
	oeuf/miracidium	Rép. Tchèque	EF094540
	Adulte	Suisse	AJ312049*

* séquence uniquement disponible en ITS-1

4.3.2.1. Analyses Phylogénétiques

Après alignement des séquences obtenues en ITS-1, ITS-2 et D2, en choisissant *Schistosoma mansoni* comme groupe extérieur d'enracinement, la construction des arbres a été envisagée par une approche en Maximum de Vraisemblance, en Neighbor-Joining et en Maximum de Parcimonie. Pour chaque analyse, la robustesse des branches a été testée par 500 bootstraps. Les paramètres nécessaires aux analyses ont été évalués à l'aide du programme Modeltest 3.1 puis inclus dans les programmes respectifs.

Pour le domaine D2, l'alignement final comprend 20 taxons et sa taille est de 570 paires de bases, incluant les zones de délétions. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985) avec une correction Γ (=0.4401). La fréquence des bases est F(A) = 0.1676 ; F(C) = 0.1966 ; F(G) = 0.3218 et F(T) = 0.3141. Le taux de transitions / transversions est de 3.4815, la proportion de sites invariables est nulle. 18 sites sont informatifs en Parcimonie. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 27).

Les analyses phylogénétiques du domaine D2 des œufs et adultes de *Trichobilharzia regenti* montrent la présence de 12 sites de variations inter-spécifiques entre les différentes Trichobilharzies et 2 sites de variations intra-spécifiques dans le groupe de *T. regenti*, séparant ainsi deux haplotypes distincts. Le premier haplotype est retrouvé chez le Colvert (PAY1, FOS, 7AD, JA, COLD, CAN et BERS), chez le Harle bièvre (HAR) et chez le Cygne tuberculé (NOLO, CYA, CYD), quelque soit l'origine de l'hôte. Le second haplotype est uniquement retrouvé chez le Souchet (JIT, SOU).

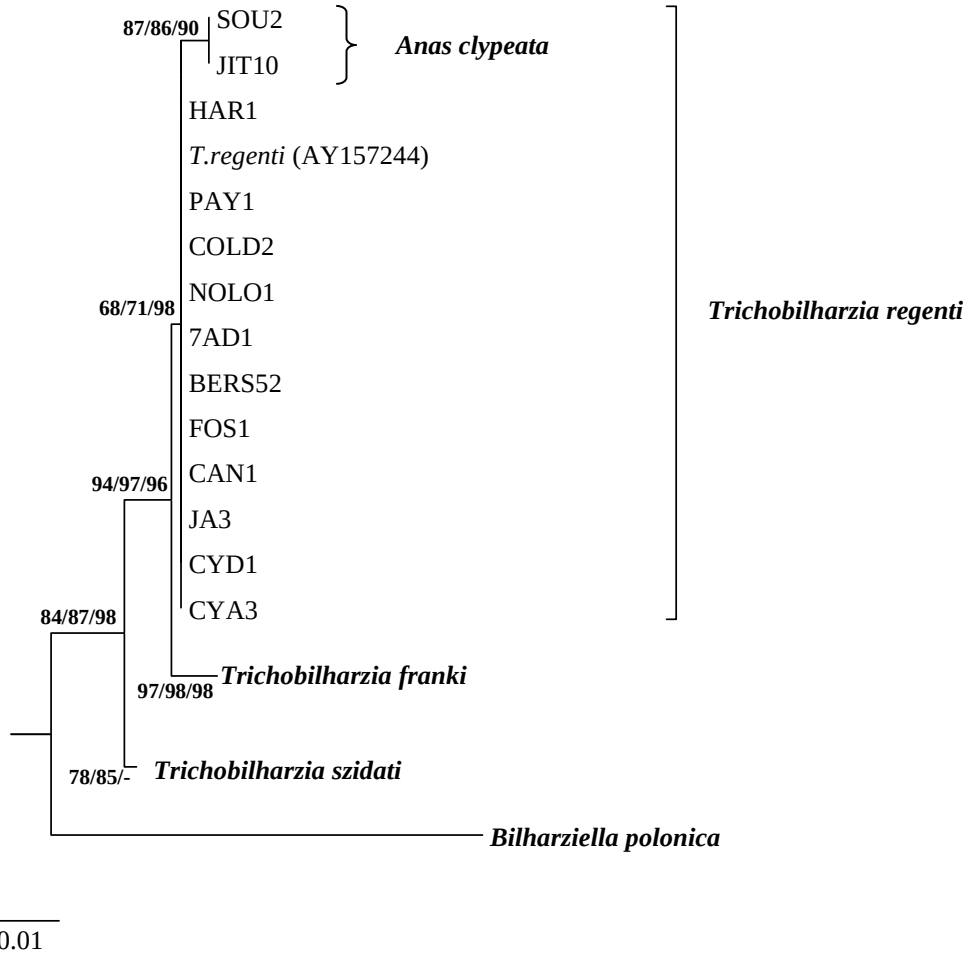


Figure 27 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance du domaine D2 des différents œufs et adultes de *T. regenti*, présentant les positions respectives des différentes Trichobilharzies. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

Pour les domaines ITS-2 et ITS-1 combinés, l'alignement final comprend 22 taxons et sa taille est de 1726 paires de bases, incluant les zones de délétions. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle General Time Reversible (GTR) avec une correction Γ (=0.5834). La fréquence des bases est F(A) = 0.2607 ; F(C) = 0.1963 ; F(G) = 0.2561 et F(T) = 0.2868, la proportion de sites invariables est nulle. Les analyses en Parcimonie sont basées sur 515

sites informatifs. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 28).

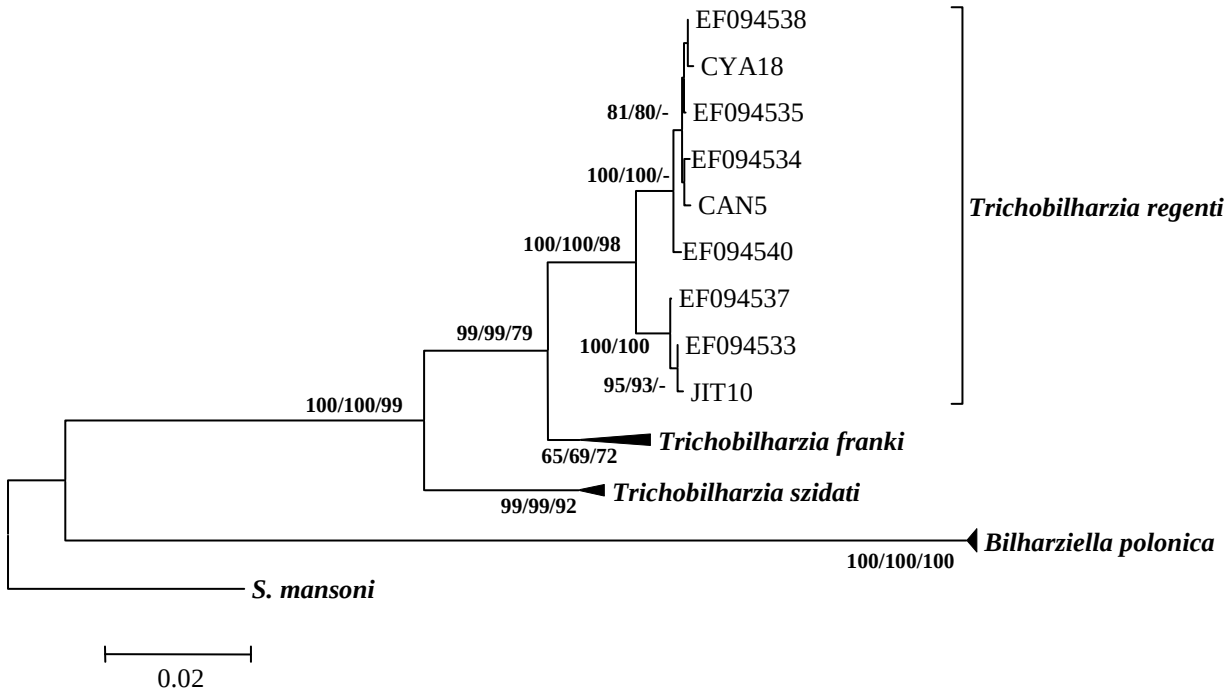


Figure 28 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance des domaines ITS-1 et ITS-2 combinés des différents œufs et adultes de *T. regenti*, présentant les positions respectives des différentes Trichobilharzies. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

En ITS, les séquences correspondant aux œufs isolés sur Souchet (*Anas clypeata*) ne diffèrent entre elles que par 2 ou 3 variations nucléotidiques, à l'exception de l'haplotype EF094540. Ces séquences possèdent plusieurs dizaines de variations intra-spécifiques avec les séquences de *T. regenti* isolées sur Colvert, sur Cygne et sur Fuligule morillon. Les variations observées dans le groupe des *T. regenti* sont reportées dans la Figure 29.

```
           2 2 3 3 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 5 5 5 5 5 5 5 6 6 6 6 6 6 7 7 7 7 7 8 8 8 8 8 9 9 9 9
         8 5 8 6 6 3 3 4 5 6 6 7 7 7 9 5 5 6 6 8 9 9 3 6 8 8 9 9 1 1 2 9 9 1 2 3 3 8 1 1 2 4
         2 0 1 1 4 1 3 5 9 1 9 1 3 5 7 6 7 0 2 6 7 9 9 0 6 7 0 2 4 8 0 8 9 4 7 1 3 4 1 9 7 1

EF094533 A G T A A A A C C C G T A G T A A C C G A G A G A A C C G A G A G G G A G G A G A A
JIT10    . . . . . . . . . . . C . . . . . . . . . . . . . . . . . . A . . . . . . . . .
EF094537 G . . . . . . . . . . . . . C . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . G .
EF094540 G A A G G . . A G G A . . T C . G A G . . . G . G G A . A G C G . A A G C A . T G G
EF094534 G . A G G G . . G G A . G C C G G A . A G C G . G G A . A G C G . A A G C A . T G G
EF094535 G A A G G . . A G G A . G . C G G A . A G C G . G G A . A G C G . A A G C A . T G G
EF094538 G A A G G . G A G G A . G T C G G A . A G C G . G G A . A G C G . A A G C A . T G G
CAN5     G A A G G . . . G G A . G C . G G A . A G C G . G G A G A G C G . A A G C A . T G G
CYA18    G A A G G . G A G G A . G T C G G A . A G C G A G G A . A G C G . A A G C A G T G G
```

Figure 29 : Alignement des séquences partielles des domaines ITS-1 et ITS-2 combinés pour *T. regenti* retrouvé chez les hôtes définitifs, représentant les variations entre les différents haplotypes. Les bases identiques sont représentées par un point (•). Seuls les sites variables avec leur position donnée au-dessus sont présentés.

4.3.3. Cas particulier du Cygne tuberculé (*Cygnus olor*)

Chez les Cygnes tuberculés provenant du lac d'Annecy, la prévalence des Trichobilharzies nasales s'est révélée très élevée (8/10). De plus, lors des autopsies, ces Cygnes présentaient des signes lésionnels très importants au niveau des cornets. Après dilacération de ces nombreuses lésions, celles-ci se sont avérées être des granulomes inflammatoires contenant chacun une quantité importante d'œufs de Trichobilharzies (Figure 30). Contrairement aux observations faites sur d'autres oiseaux aquatiques (Colvert, Souchet, Fuligule morillon), seuls les Cygnes présentaient ce type de lésion et un nombre aussi important d'œufs au niveau de la muqueuse nasale. Tous ces œufs appartiennent à une seule et même espèce : *Trichobilharzia regenti*.

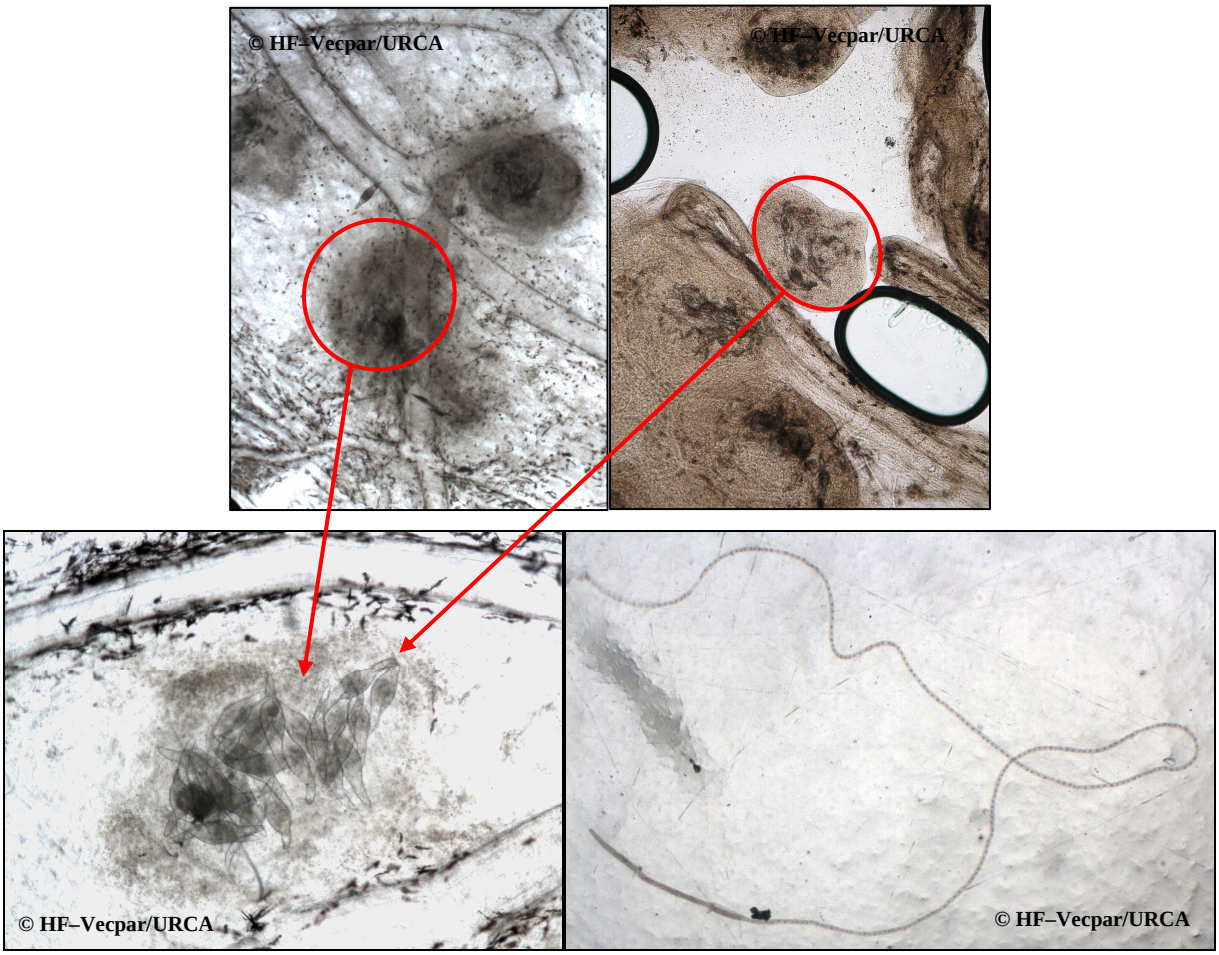


Figure 30 : Granulomes réactionnels provoqués par la présence d'œufs de *T. regenti* et long fragment d'adulte retrouvé au niveau de la muqueuse nasale

Dans quelques cas, des fragments d'adultes ont également pu être isolés au niveau de la paroi des vaisseaux des cornets. Toutefois, malgré la présence abondante d'œufs dans la muqueuse, les vers adultes sont rares, et leur isolement reste toujours aussi difficile.

RÉSULTATS : Partie III

Autres Schistosomes Aviaires et Hôtes définitifs

5.1. Isolement et prévalences des œufs et adultes

Bilharziella polonica fut isolé uniquement sur les oiseaux provenant de Champagne-Ardenne. Chez ces oiseaux, les œufs étaient situés principalement au niveau de la paroi des caeca, et les adultes au niveau des veines hépatiques. Chez les Cygnes tuberculés, au niveau viscéral, 6 oiseaux étaient positifs sur 13 autopsiés (46%) : *B. polonica* était coparasite d'*Allobilharzia* sp. (2 Cygnes/6), de *Trichobilharzia* sp. (2/6) et enfin d'*Allobilharzia* sp. et *Dendritobilharzia pulverulenta* (2/6). La présence simultanée de *B. polonica* avec des Trichobilharzies (*T. franki*, *T. szidati*) a été observée chez 6 Colverts, 8 Sarcelles d'hiver, un Souchet et un Fuligule morillon. Enfin, il a été retrouvé seul chez 3 Colverts, 1 Sarcelle d'hiver, 2 Hérons cendrés, 1 poule d'eau, 1 Grue cendrée et 1 canard Pilet (Tableau X).

Tableau X : Prévalences observées chez les hôtes définitifs pour *Bilharziella polonica*

Espèce hôte	examinés	Positifs	Prévalence
A. platyrhynchos	33	9	**27 %**
A. crecca	15	9	**60 %**
Anas clypeata	5	1	**NC**
Anas acuta	2	1	**NC**
Cygnus olor	11	4	**36 %**
Aythya fuligula	1	1	**NC**
Ardea cinerea	4	2	**NC**
Gallinula chloropus	3	1	**NC**
Grus grus	3	1	**NC**

NC : non calculé (< 10 exemplaires)

L'isolement des œufs pour le genre *Bilharziella* a été réalisé dans les mêmes conditions que celles décrites préalablement pour les œufs de Trichobilharzies. Cependant, leur caractérisation est rendue plus aisée par leur forme caractéristique (Figure 31).

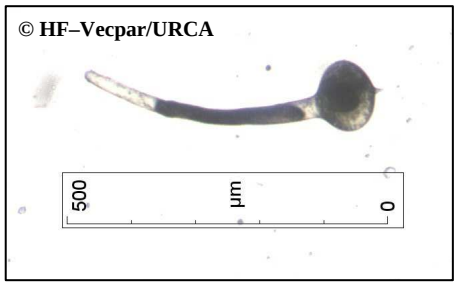


Figure 31 : Œuf de *B. polonica* isolé sur Cygne tuberculé (*Cygnus olor*)

Les adultes de *B. polonica* et de *Dendritobilharzia pulverulenta* sont plus faciles à isoler et à identifier par leur taille importante et les caractères morphologiques qui les caractérisent (Figure 32). La localisation des adultes de *B. polonica* étant principalement hépatique, des femelles ont toutefois été isolées au niveau caecal, proches du lieu de ponte.

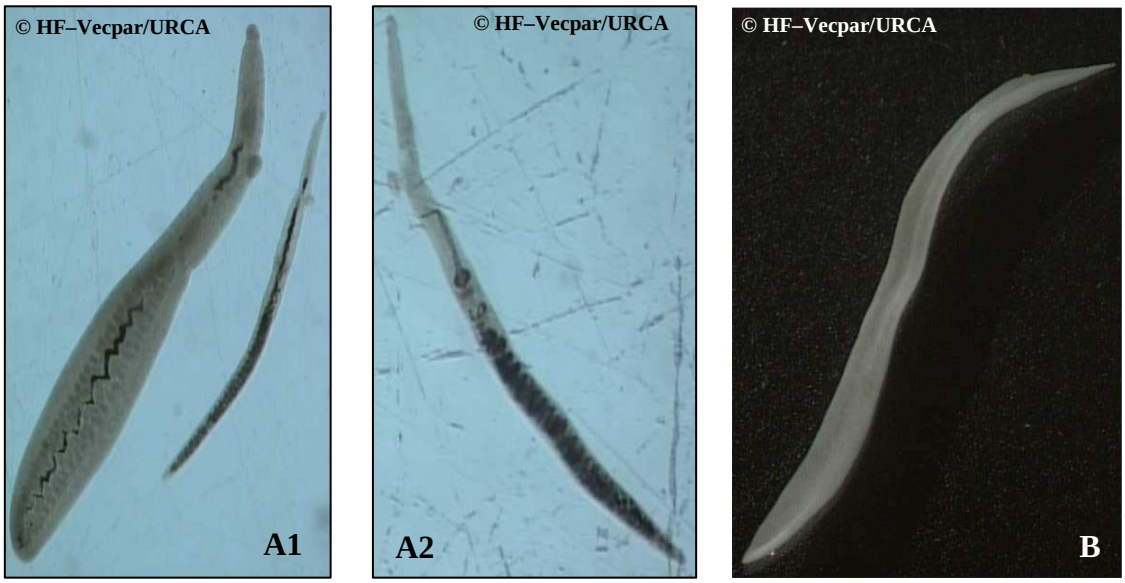


Figure 32 : Vers adultes isolés chez le Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) : A - *Bilharziella polonica* : A1. Vers adultes mâles et femelles ; A2. Femelle avec œuf ; B - *Dendritobilharzia pulverulenta*

5.2. Polymorphisme morphologique des vers adultes : Seasonal morphological variations in bird Schistosomes (Bayssade-Dufour *et al.*, 2006)

SEASONAL MORPHOLOGICAL VARIATIONS IN BIRD SCHISTOSOMES

BAYSSADE-DUFOUR C.*, JOUET D.**, RUDOLFOVA J.***, HORÁK P.*** & FERTÉ H.**

Summary :

The present work is a contribution to the systematics of *Bilharziella* and *Dendritobilharzia*. Wildfowl was killed in hunting seasons or found dead in Champagne-Ardenne region, France, and autopsied with focus on schistosomes. Seven *Anas platyrhynchos* (mallards), one *Ardea cinerea* (grey heron) and two *Cygnus olor* (mute swans) were parasitized by *Bilharziella*. One *C. olor* was parasitized by *Dendritobilharzia*. Depending on season and hosts, various morphological forms of *Bilharziella* suggesting several species were observed. The differences in male and female worms concerned the morphology of genital apparatus, the spination on suckers, the body size and proportions. However, the comparison of DNA sequences led to a conclusion that these forms belonged to one species, *Bilharziella polonica* (Kowalewski, 1895). The morphological features and the body sizes of our samples of *Dendritobilharzia* seemed to differ from the type species of *D. pulverulenta* (Braun, 1901). Nevertheless, molecular analysis confirmed identity. We hypothesize that the differences in *Bilharziella* and *Dendritobilharzia* might be linked to internal host factors (e.g. hormonal levels), and influenced by season, host, and worm age. The definition of the genera *Bilharziella* and *Dendritobilharzia* was amended.

KEY WORDS : avian schistosome, *Bilharziella polonica*, *Dendritobilharzia pulverulenta*, morphology, systematics, molecular biology, France.

Résumé : VARIATIONS MORPHOLOGIQUES SAISONNIÈRES CHEZ LES SCHISTOSOMATIDAE AVIAIRES

Ce travail est une contribution à la systématique de Bilharziella *et* Dendritobilharzia *(Trematoda, Schistosomatidae). Des oiseaux sauvages, tués en période de chasse ou trouvés morts en région de Champagne-Ardenne (France), ont été autopsiés pour rechercher la présence de schistosomes. Sept* Anas platyrhynchos *(colvert), un* Ardea cinerea *(héron cendré) et deux* Cygnus olor *(cygne tuberculé) ont été trouvés parasités par des* Bilharziella. *Un* Cygnus olor *est parasité par* Dendritobilharzia. *Selon la saison et la nature de l'hôte, plusieurs morphes de* Bilharziella, *suggérant plusieurs espèces, ont été observés. Les différences concernaient la morphologie de l'appareil génital, la spinulation des ventouses, la taille et les proportions du corps, chez les mâles comme chez les femelles. Or la comparaison des séquences d'ADN conduit à la conclusion que ces morphes appartiennent à une seule espèce,* Bilharziella polonica *(Kowalewski, 1895). Chez nos spécimens de* Dendritobilharzia, *des caractères morphologiques et la proportion de certains organes paraissent différents de ceux de* D. pulverulenta *(Braun, 1901), espèce type. Or, l'analyse moléculaire confirme l'identité de nos spécimens avec celle de l'espèce type. Nous formulons l'hypothèse que des différences dans* Bilharziella *et* Dendritobilharzia *pourraient être liées à des facteurs internes de l'hôte, taux hormonal notamment, et influencées par la saison, l'hôte et l'âge des vers. La définition des genres* Bilharziella *et* Dendritobilharzia *est amendée en fonction de ces observations.*

MOTS CLÉS : *bilharzie aviaire,* Bilharziella polonica, Dendritobilharzia pulverulenta, *morphologie, systématique, biologie moléculaire, France.*

INTRODUCTION

Recently, occurrence of bird schistosomes and swimmer's itch became a problem in recreational areas, having important consequences, direct (health complication) and indirect (decrease of travel industry). Recent and numerous data were published for *Trichobilharzia* spp. in systematics and pathogenicity, in experimental and natural hosts: birds, mammals and humans. Conversely, data on *Bilharziella* and *Dendritobilharzia* remained less abundant. Occurrence of *Bilharziella* and/or *Dendritobilharzia* in Europe and all over the world were studied by some authors (Ejsmont, 1929; Szidat, 1929; Mehra, 1940; Bykhovskaya-Pavlovskaya & Rizhikov, 1958; Palm, 1965; Khalifa, 1972 and 1976; Sulgovstowska, 1972; Martorelli, 1981; Kolárová *et al.*, 1989 and 1997; Sepulveda *et al.*, 1994).

Furcocercariae of *Bilharziella* were reported as a causal agent of swimmer's itch in Germany by Szidat (1930). Horák & Kolárová (2000) also observed penetration of some cercariae of *B. polonica* into the skin of tails and

* USM 602, Biologie parasitaire, Systématique et Évolution, MNHN, 61, rue Buffon,75231 Paris cedex 05, France.
** EA 3800, UFR de Pharmacie, 51, rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France.
*** Charles University, Faculty of Science, Department of Parasitology, Vinicna 7, 12844 Prague 2, Czech Republic.
Correspondence : Hubert Ferté, EA 3800, UFR de Pharmacie, 51,rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France.
Tel.: 00 (33)3 26 91 35 97 – Fax: 00 (33)3 26 91 35 97.
E-mail: hubert.ferte@univ-reims.fr

legs of mice, and the schistosomulae were able to survive and migrate to the lungs in this model. On the other hand, *B. polonica* role in swimmer's itch in Poland was not confirmed by Zbikowska (2003, 2004). No data were published on a possible pathology caused by *Bilharziella* dwelling in birds.

Furcocercariae of *Dendritobilharzia* were reported as a causal agent of swimmer's itch in Germany by Dönges (1965), and in New Zealand by Rind (1989). Pathological changes in hosts naturally infected by *Dendritobilharzia* were studied by Levine *et al.* (1956), Wilson *et al.* (1982) and Wojcinski *et al.* (1987).

Systematics of *Bilharziella* Looss, 1899 was reviewed by Yamaguti (1971) and Khalil (2002). Systematics of *Dendritobilharzia* Skrjabin and Zakharow, 1920 was studied by several authors (Mehra, 1940; Cheatum, 1941; Macko, 1959; Baugh, 1963; Ulmer & Van de Vusse, 1970; Farley, 1971; Van de Vusse, 1979 and 1980; Leite *et al.*, 1982; Rind, 1989; Sepulveda *et al.*, 1994). The present work describes *Bilharziella* and *Dendritobilharzia* found in Champagne-Ardenne region, France. It focuses on systematics of *Bilharziella* and *Dendritobilharzia* using morphological and molecular investigations.

MATERIAL AND METHODS

Birds were either killed during the hunting period or found dead by members of ONCFS (*Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage*) and network SAGIR. They originated mainly from Champagne region: Der-Chantecoq lake and surrounding ponds. Nine *Anas platyrhynchos* (mallards), four *A. clypeata* (shovelers), two *A. strepera* (gadwalls), four *A. crecca* (teals), one *Aythya ferina* (pochard), five *C. olor* (mute swans), two *Ardea cinerea* (grey herons), one *Gallinula chloropus* (moorhen) and three *Larus ridibundus* (black-head gulls) were examined. They were frozen before autopsy. The adult worms were found after the dissection of their intestinal, mesenteric and hepatic vessels and were fixed in alcohol or formaline, stained in chlorhydric carmine, dehydrated, mounted in Canada balsam and drawn with *camera lucida*.

Specimens of worms (*Bilharziella* and *Dendritobilharzia*) were analyzed for molecular biology. For each worm the anterior part of the body was cut for mounting, and morphological evaluation and determination. DNA extraction was done using the Qiamp DNA mini kit (Qiagen, Germany) following manufacturer's instructions. During the first step (tissue lysis), the worms were crushed one by one using a piston pellet (Treff, Switzerland), and the DNA was eluted in 50 µl of the elution buffer provided by the manufacturer. PCR was performed in a 50 µl volume using 5 µl of extracted DNA solution and 50 pmol of each of the primers C2'b (5'-GAAAAGTACTTTGRARAGAGA) and D2 (5'- TCCGTGTTTCAAGACGGG) for amplification of D2 domain of 28S rDNA. The PCR mix contained (final concentrations) 10 mM Tris HCl, pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, KCl 50 mM, Triton X 100 0.01 %, 200 µM each dNTP, and 0.25 µl (1.25 units) of *Taq* polymerase (Qiagen, Germany). Initial denaturation at 94° C for five min was followed by 40 cycles of denaturation at 94° C for 45 s, annealing at 50° C for 45 s and extension at 72° C for two min with a final elongation time of 10 min at 72° C. Amplicons were analysed by electrophoresis in 1.5 % agarose gel containing ethidium bromide. PCR products were directly sequenced in both directions by Qiagen (Hilden, Germany) using the primers used for DNA amplification. Sequence alignment was performed using the MUST software package (Philippe, 1993). The sequences are deposited in Genbank (accession Nos. DQ813437 to DQ813443).

RESULTS

Bilharziella was found in two *C. olor* (out of five examined) and *A. cinerea* found dead in autumn in Outines. *Bilharziella* was also found in seven *A. platyrhynchos* (out of nine examined), three coming from Vanault-les-Dames and killed by hunting in September and October, and four from Larzicourt, killed at the end of June (Table I). *Dendritobilharzia* was only found in one *C. olor* parasitized also by *Bilharziella*. Previously, *Bilharziella* and *Dendritobilharzia* were rarely mentioned in findings from wildfowl in Western Europe.

BILHARZIELLA (Figs 1, 2)

Specimens have been found in mesenteric or hepatic vessels. Their digestive and genital apparatuses allowed identification as *Bilharziella* sp. Besides the characters common to *Bilharziella*, the worms displayed an excretory system visible only at the end of the body. The genital apparatus in males showed a long gynaecophoric canal extending from the level of oral sucker to the hindbody. It appeared as a tubercled strip or drainpipe, opened or closed. Size and morphological features allowed to distinguish four morphological types: one from *C. olor* (71 TO), one from *A. cinerea* (72 TO, 76 TO 1, 2) and two in *A. platyrhynchos*: one observed in June (64 TO, 65 TO, 77 TO, 78 TO) and the others in September-October (63 TO, 66 TO, 73 TO, 74 TO). Only one male was observed in each *C. olor* which died in November. One of the worms put in a drop of water measured 5,830 µm in length, the diameters of oral sucker and acetabulum were respectively 150 µm and 190 µm, the distance between the two suckers was

Parasite	Host	Location in bird	Registration number (Paris)	Geographical data	Death of the bird
Bilharziella polonica large morph without spine	*Cygnus olor* (DER 1)	Mesenteric, male	71 TO 1	Outines Landres pond 4° 41' 14" E	November, 25
	Cygnus olor (DER 3)	Mesenteric, male	71 TO 2	48° 34' 33" N	*id.*
Bilharziella polonica large morph without spine	Ardea cinerea (ARD 1)	Mesenteric, male	72 TO 1	Outines	Autumn
		Mesenteric, female	76 TO 1		
		Mesenteric, female	76 TO 2		
Bilharziella polonica medium morph without spine	*Anas platyrhynchos* (KAL 5)	Mesenteric, male	63 TO 1	Vanault-Les-Dames Neuf pond 4° 47' 12" E	September, 30
		Mesenteric, female	74TO2	48° 50' 31" N	
	Anas platyrhynchos (KAL 9)	Mesenteric, female	66 TO 1	*id.*	October, 6
		Mesenteric, male	73 TO 1		
Bilharziella polonica medium morph with spines	*Anas platyrhynchos* (FRA 1)	Hepatic/mesenteric male	64 TO 1	Larzicourt Der-Chantecoq lake 4° 43' 04" E	June, 29
		Hepatic/mesenteric male	77 TO 1	48° 34' 33" N	
		Hepatic/mesenteric male	78 TO 1		
	Anas platyrhynchos (FRA 2)	Hepatic/mesenteric female	65 TO 1	*id.*	June, 29
Dendritobilharzia pulverulenta	*Cygnus olor* (DER 1)	Hepatic males and females	55 TO 1, 10	Outines Landres pond 4° 41' 14" E 48° 34' 33" N	November, 25

Table I. – Origin of samples.

1,310 µm (Fig. 1J). One male and two females occurred in *A. cinerea* found dead in autumn. The male was not measured, because it was fragmented (Fig. 1E). The two females put in a drop of water had a respective length of 2,149 and 2,161 µm. The diameter of their oral sucker was 52 µm, acetabulum 73 µm and the distance between their two suckers 401 µm (Fig. 1F). In the worms recovered from *A. cinerea* and from *C. olor*, there were no spines on the suckers and males showed a reduced seminal vesicle. In *A. platyrhynchos* hunted in Vanault-les-Dames in autumn (September-October), nine males and three females of *Bilharziella* were studied. Five males and one female were examined from *A. platyrhynchos* from Larzicourt killed in summer (June). All the worms were measured after fixation and staining. Always males were longer and wider than females. The lengths in samples from ponds of Vanault-les-Dames were: 2,977 ± 366 µm (range 2,628-3,878) for nine males and 1,664 ± 112 µm (1,556-1,780) for three females. Males and female from Larzicourt measured in lengths 3,165 ± 481 µm (2,410-3,707) and 1,811 µm, respectively. All the samples appeared to be adult. Specimens of *Bilharziella* from *A. platyrhynchos* killed in Vanault-les-Dames in autumn were named A group, and those from *A. platyrhynchos* killed in Larzicourt in summer S group.

In A group, the bodies of male and female *Bilharziella* were relaxed. The males (Fig. 1A) showed a reduced linear seminal vesicle, with prostatic glands similar to the homologous organs (Fig. 1B) in the already synonymized species *Chinhuta indica* Lal, 1937. The females had a sinuous S-shaped ovary, a uterus with one (or none) poorly developed egg devoid of long spine, and a vitelline mass in midbody and hindbody (Fig. 1C, D). The hindbody was slender. The oral sucker and the acetabulum of males and females were smooth, devoid of spines (Fig. 1H, I). In S group, the males were frequently constricted (Fig. 2A, D). They displayed a long spiraled seminal vesicle (Fig. 2G) more similar to the vesicle of *Bilharziella lali* Baugh, 1963 than that reported in *B. polonica* (Kowalewski, 1895). The female had a globular ovary and vitelline follicles of equal dimensions filling the midbody and hindbody (Fig. 2K). The uterus and the hindbody were widened. The oral sucker and the acetabulum of males and female were spiny (Fig. 2B, C, E, F, H, I).

Molecular analysis performed with specimens from *C. olor, A. cinerea* and *A. platyrhynchos* (A and S groups) showed that all isolates belonged to *Bilharziella polonica*; the sequences of samples coming from the above mentioned birds were identical. They were homologous in 100 % with the two sequences depo-

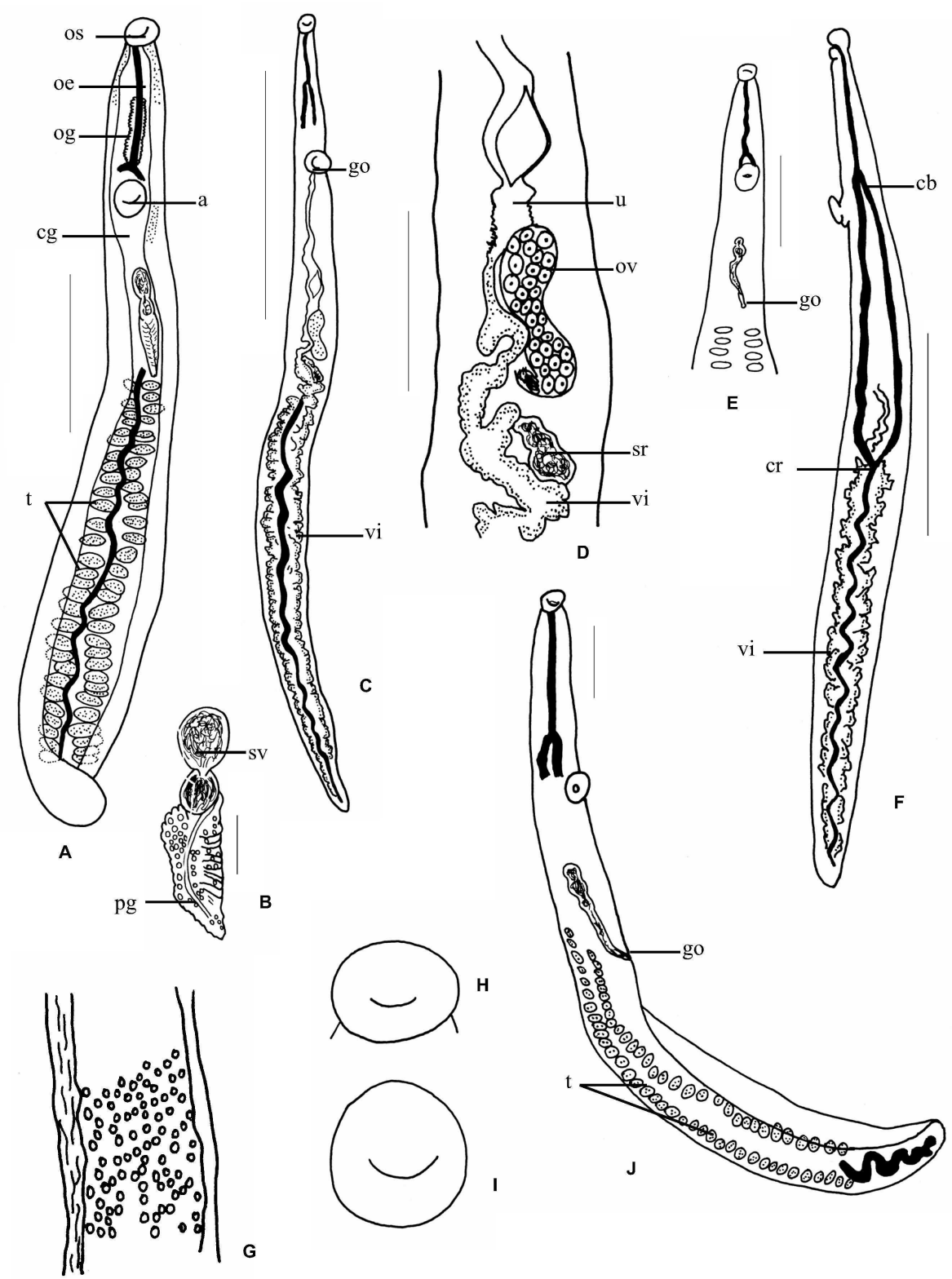


Fig. 1. – *Bilharziella polonica* autumn morph (A-D, G-I: *Anas platyrhynchos*; E, F: *Ardea cinerea*; J: *C. olor*) (male: A, B, E, G, J; female: C, D, F, H, I).

A: ventral view (63 TO). B: genital apparatus. C: ventral view (66 TO). D: genital apparatus. E: hinbody (*Ardea cinerea*). F: lateral view (*Ardea cinerea*). G: details of canalis gynaecophorus (72 TO_1). H: oral sucker (76 TO_2). I: acetabulum. J: ventro-lateral view (*Cygnus olor*) (71 TO_1).

Abbreviations. – a: acetabulum, cg: canalis gynaecophorus, cb: caeca bifurcation, cr: caecal reunion, go: genital opening, i: intestine, oe: oesophagus, og: oesophageal glands, os: oral sucker, ov: ovary, pg: prostatic gland, sr: seminal receptacle, sv: seminal vesicles, t: testes, u: uterus, vi: vitelline folicles (scale bars: A, C, E, F, J = 500 µm; B, D = 100 µm).

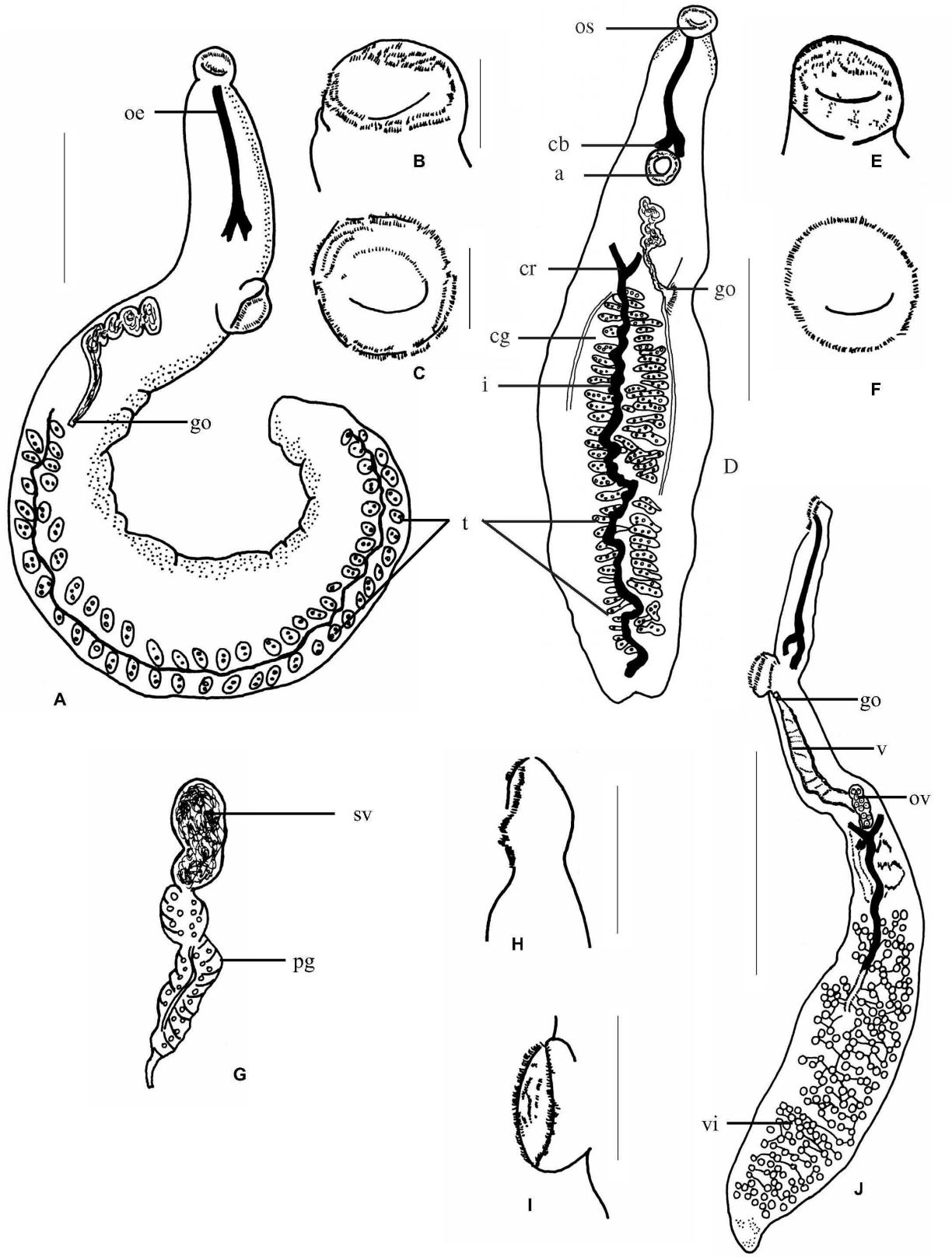


Fig. 2. – *Bilharziella polonica* summer morph (*Anas platyrhynchos*) (A-C, G-H: 77 TO, D-F, 64 TO, I-K: 65 TO) (male: A-H; female: H-J). A: lateral view. B: oral sucker. C: acetabulum. D: ventral view. E: oral sucker. F: acetabulum. G: genital apparatus. H: acetabulum. I: Female, oral sucker. J: Female, lateral view.

Abbreviations. – a: acetabulum, cg: canalis gynaecophorus, cb: caeca bifurcation, cr: caecal reunion, go: genital opening, i: intestine, oe: oesophagus, ov: ovary, os: oral sucker, pg: prostatic gland, sv: seminal vesicles, t: testes, u: uterus, vi: vitelline folicles (scale bars: A, D, K = 500 µm; B, C, I, J = 100 µm).

sited in Genbank, one obtained from a sample isolated from *Anas platyrhynchos* sacrificed in Ukraine, access number AY 157240 (Snyder & Loker, 2000) and the second one obtained from ocellate furcocercariae of *Bilharziella* emitted by *Planorbis planorbis* from the Czech Republic, access number AF 167088 (Lockyer *et al.*, 2003).

DENDRITOBILHARZIA (Fig. 3)

Three females and three males out of ten adult worms, found in hepatic vessels in one *C. olor* (55 TO 1-6) and determined as *Dendritobilharzia* sp. were morphologically studied. The length and the width of the fixed specimens were 12,740 ± 770 × 1,450 ± 130 µm, without a significant difference between the males and the females. In both sexes oral and ventral suckers were not present (Fig. 3A, D). The digestive tract begun by oral opening situated subterminally. Oesophagus in its distal part was surrounded by oesophageal glands (Fig. 3B, E). Caecal bifurcation was at the level of cirrus pouch in males, or ovary, Mehlis' gland and uterus in females. Two short caeca reunited into a long dendritic intestine running zigzag to the posterior end of the body. In females, numerous eggs were present in the uterus at the morula stage; they were ovoid except for one with a terminal spine (Fig. 3F). In males the genital apparatus appeared to lack the gynecophoric canal. However, the edges of worms bore scattered spines, creases and bulges, participating probably in worm coupling. Cirrus pouch, seminal vesicle and prostatic cells were situated in the forebody. Ejaculatory duct opened in large genital bulb (Fig. 3C). A high number of testes organized in four lines were localized near the dendritic intestine. The sequence of the D2 domain of the 28S rDNA is 100 % homologous with that of *Dendritobilharzia pulverulenta* isolated from *Gallus gallus* (AF167090 or AY157241)

DISCUSSION

A species is considered as separate among closely related ones on the basis of constant differences in morphology of adult worms, specificity for first molluscan hosts, shape and size of eggs harbouring a miracidium and typical sequences in genome. Usually ITS (Internal Transcribed Spacer) sequences served as molecular markers for species identification of *Trichobilharzia* (Dvorak *et al.*, 2002). In our work, the D2 domain of 28 rDNA has been used as a relevant informative marker which is supported by use of D2 for discrimination of four species of human schistosomes (Littlewood & Johnston, 1995). Males and females of *Bilharziella* from *C. olor, A. cinerea* and *A. platyrhynchos* showed morphological differences, but molecular analysis proved they belong to one species: *B. polonica*. In addition males and females of *Dendritobilharzia* from *C. olor* seemed morphologically different from the type species, but molecular data confirmed they belong to one species: *D. pulverulenta*.

BILHARZIELLA

Khalifa (1972) obtained cercariae of *B. polonica* from *Planorbis planorbis, Bathyomphalus contortus* and *Planorbarius corneus*, never from *Anisus vortex*, Lymnaeidae and Physidae. He succeeded an experimental infection of young *A. platyrhynchos* with furcocercariae emitted by naturally infected Planorbidae. The ducks were sacrificed at different periods after exposure. With respect to their age, the worms presented certain variability. However, despite their differences in morphology, Farley (1971) suggested a synonymy between *B. lali* Baugh, 1963 and *B. polonica* (Kowalewski, 1895).

In the present study the two observed forms (A and S) of *Bilharziella* from *A. platyrhynchos* differed in several morphological characters according to the season (*e.g.* presence or absence of spines on the two suckers, morphology of genital apparatus). In all the birds killed in autumn male and female genital apparatuses were always reduced, independently of the size of the worms. It was impossible to characterize several structures due to immaturity of some worms. Species identification of both forms (A and S) as *B. polonica* was proved by molecular tools.

A seasonal influence of the host on blood parasites has been reported in amphibians by Stunkard (1959) and Combes (1967). Stunkard pointed out that *Polystoma* (a monogenean parasite) was strictly haematophagous and could ingest the hormone-containing blood of its hosts. Combes observed correlation between the sexual cycle of *Polystoma* and the amphibian host. In adult birds of *A. platyrhynchos*, seasonal variation in the level of hormones present in the blood is also well known (Dorst, 1956). The level increases in spring and summer and decreases in autumn and winter. The increase of hormones in the blood was linked with the lengthening of the days in spring and summer. The day light activated the process of seasonal growing of gonads, inducing nuptial parades and nesting. Conversely, the shortening of days in autumn and winter stopped the process. The hormones of birds could influence the worm morphology and, based on the above examples, *Bilharziella* worms living in the blood of birds could monitor hormonal levels, controlling in this way onset and cessation of reproduction according to the season. In agreement with this hypothesis, we recorded influence of the season on the morphology of *B. polonica*. In addition, we can also speculate on *e.g.* influences of time of infection, worm natural ageing/maturation and size of bird host.

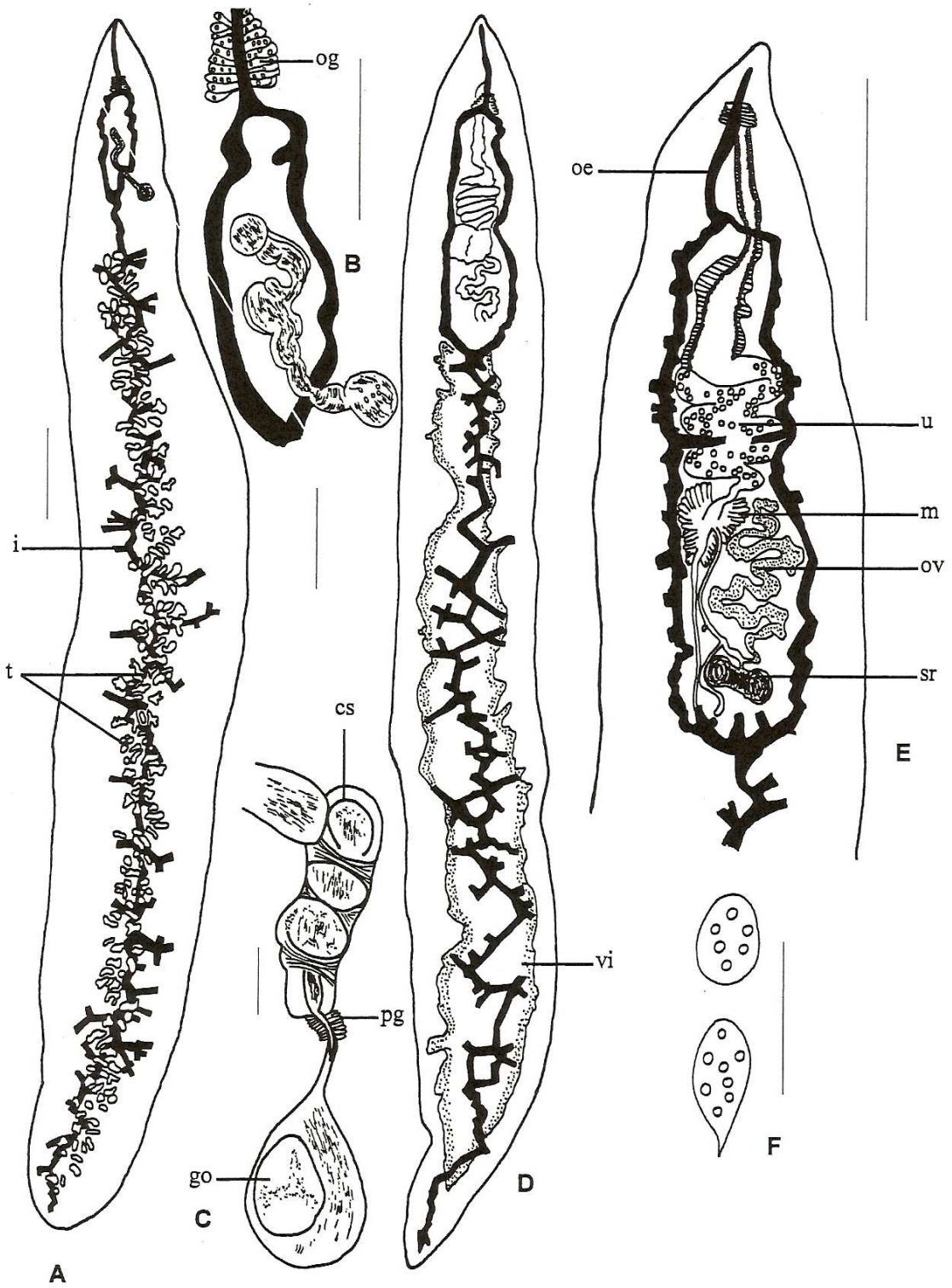


Fig. 3. – *Dendritobilharzia pulverulenta* (*Cygnus olor*) (male: A-B; female: D-F).
A: dorsal view (55 TO_1). B: genital apparatus, dorsal view (55 TO_3). C: genital apparatus, ventral view. D: ventral view (55 TO_4). E: genital apparatus (55 TO_6). F: eggs.
Abbreviations. – cs: cirrus sac, go: genital opening, i: intestine, m: Mehlis' gland, oe: oesophagus, og: oesophageal glands, ov: ovary, pg: prostatic gland, sr: seminal receptacle, t: testes, u: uterus, vi: vitelline folicles (scale bars: A, D, E = 1 mm; B = 500 µm; C, F = 100 µm).

The status of *Bilharziella* Looss, 1899 was discussed by several authors (Lal, 1937; Baugh, 1963; Yamaguti, 1971; Khalifa, 1972; Liu & Bai, 1976; Farley, 1971; Khalil, 2002). Farley (1971) synonymized *Chinhuta indica* Lal 1937 and *Bilharziella lali* Baugh 1963 *i.e.* he synonymized the genera *Chinhuta* and *Bilharziella*. For both he admitted the absence of gynaecophoric canal. Yamaguti (1971) maintained validity of the two genera. He underlined the presence of gynaecophoric canal in *Chinhuta*. Khalil (2002) accepted the Farley's view. We also agree with synonymy of *Bilharziella* and *Chinhuta*, and the presence of a gynaecophoric canal in both morphs. This canal can be opened or folded over.

In the present work, the characters of the genus *Bilharziella* can be corrected as follows: Suckers are well developed, smooth or spiny, oral sucker is smaller than acetabulum. Caecal bifurcation is situated near acetabulum, at the level or in front of it. The common caecum is without lateral branches and runs zigzag. In males, gynecophoric canal is present, clearly obvious if closed or less apparent if opened. It is marked by two longitudinal bands: one smooth and the second one covered by tubercles extending from the inferior part of the oral sucker to the hindbody (Fig. 1G).

Dendritobilharzia

Van de Vusse (1979) noted locations of *Dendritobilharzia* in several arteries of birds (aorta, femoral and renal arteries, etc.) and admitted that these locations were different in surface ducks and diving ducks. The corresponding eggs were scattered in different tissues: intestine, liver, kidney of the bird hosts, and appeared to be non-developed. Our specimens of adult worms were found in hepatic vessels and no egg was found in the surrouding tissues. Morphology of our samples of males and females of *Dendritobilharzia* from *C. olor* seemed to be different from *D. pulverulenta* (Braun, 1901) described in Africa, and specimens found by Ulmer & Van de Vusse (1970) in North America, and Rind (1989) in New Zealand. *D. pulverulenta* was reported also in Germany by Palm (1965), Poland by Sulgostowska (1972) and Khalifa (1972), the Czech Republic by Kolarova *et al.* (1989, 1997), Yakutiya by Bykhovskaja-Pavlovskaja & Rizhikov (1958), Texas by Canaris *et al.* (1981) and India by Chauhan *et al.* (1973).

Body sizes of worms in our study were different from those mentioned by Macko (1959) and Van de Vusse (1980). Our female worms from *C. olor* morphologically resembled those of *D. asiatica* Mehra, 1940, with one spiny egg among numerous ovoid eggs. Males in our findings had a large genital bulb as *D. anatinarum* Cheatum, 1941; unfortunately, the male of *D. asiatica* was never described. Although Freitas & Costa (1972) mentioned *D. anatinarum* in Brazil and Leite *et al.* (1982) also recognized this species, Macko (1959) and Ulmer *et al.* (1970) consider it as a synonym of *D. pulverulenta* (Braun, 1901). Van de Vusse (1980) considered *D. asiatica* to be a *species inquirenda*, whereas Martorelli (1981) considered it as a valid species differing from *D. pulverulenta* and *D. rionegrensis* n. sp. Evaluating their specificities towards first intermediate hosts, it was difficult to confirm their synonymy. In Poland, Khalifa (1976) reported *Anisus vortex* and *Planorbis planorbis* as the first naturally infected hosts of *D. pulverulenta*, Leite *et al.* (1982) succeeded in the experimental infection of *Biomphalaria straminea* by miracidia identified as *D. anatinarum*. These miracidia came from eggs found in naturally infected *Cairina moschata*. The same authors failed in attempts to infect *Aplexa rivalis*, *Biomphalaria glabrata* and *Lymnaea columella* by miracidia of *D. anatinarum*. In New Zealand, Rind (1989) failed to establish *D. pulverulenta* infection in *Potamopyrgus antipodarum, Gyraulus corinna* and *Lymnaea tomentosa*.

Leite *et al.* (1982) and Rind (1989) observed that the maturation of *D. anatinarum* and *D. pulverulenta* eggs represents a long process. The intra-uterine eggs, as well as the deposited eggs are at *morula* stage. They grow and become mature outside the body of the female worms, in the intestinal mucosa of the bird host. The presence of numerous intra-uterine eggs, branching intestine and the absence of oral and acetabular suckers are the main differences between *Dendritobilharzia* and *Bilharziella*.

Our morphological and molecular data lead to a conclusion that *D. pulverulenta* is a species that could morphologically differ with respect to the physiological status of and location within the bird host. It means that it is extremely difficult to determine this species only by morphology of the adult worms. We think that the shape and size of genital bulb is not a species-specific feature and it could reflect physiological status of the male worm and its bird host.

An improved species diagnosis is proposed for *Dendritobilharzia pulverulenta*: Mouth devoid of oral sucker. Body devoid of acetabulum. Oesophageal glands near the caecal bifurcation. Caecal reunion in males at the level of the genital pore, in females at the level of ovary and seminal receptaculum. Common caecum long, zigzag, with lateral diverticula. In males, numerous testes lie posterior to caecal reunion on each side of common caecum; they occur in two, three or four rows reaching the posterior body end. The cirrus pouch contains a bipartite seminal vesicle, prostate and small or dilated genital bulb with a pore. The female genital system consists of a long and sinuous ovary, intercaecal seminal receptaculum lying behind ovary, Mehlis gland, sinuous uterus full of eggs, and metraterm ending in egg-laying pore near the oesophagus. Vitellaria spread from the level of ovary or seminal receptaculum until

the hindbody. Excretory apparatus runs into a terminal pore. In male and female, crenated and brawny edges of the body with scattered spines and bulges are probably used during mating. The gynaecophoric canal is absent in males. The egg maturation continues after release into the intestine of bird host.

In the future it would be of interest to characterize the seasonality of the above mentioned morphological forms in experimental infections of birds. This might stimulate further work of taxonomists (intraspecific morphological variability) and physiologists (hormonal influence on parasite development). In addition, the naturally infected snails in the ponds and lakes where aquatic birds come from should be investigated in order to identify the intermediate hosts of *B. polonica* and *D. pulverulenta*. The intermediate host specificity should be verified experimentally by exposure of different planorbid snails to the above miracidia. The ability of cercariae to penetrate the skin of and migrate in vertebrates (birds, mammals) should also be tested.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Yves Maupoix, Mickael Combrexelle and the technical staff of ONCFS of lac du Der-Chantecoq, network SAGIR, Matthieu Kaltenbach and Grégoire Payen for their help in providing samples. Dr Jérôme Depaquit for his friendly contribution. Monique Boutry, Chantal Grimplet and Jimmy Cassone for their technical assistance. Financial support for this study was provided by ONCFS (*Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage*). The research of J. Rudolfová and P. Horák was supported by: MSMT 0021620828 and GAUK 166/2005/B-BIO/PrF.

REFERENCES

BAUGH S.C. Contributions to our knowledge of digenetic TrematodesVI. *Zeitschrift fur. Parasitenkunde*, 1963, *22*, 303-315.

BYKHOVSKAJA-PAVLOSKAJA I.E. & RIJIKOV K.M. [Schistosomes (Schistosomatidae Looss, 1899) from anatids in Yakutiya.] *Parazitologiceskij Sbornik Zoologiceskovo Instituta Akademii Nauch SSSR*, 1958, *18*, 283-294.

CANARIS A.G., MENA A.C. & BRISTOL J.R. Parasites of waterfowl from southwest Texas: III. The green-winged teal *Anas crecca*. *Journal of Wildlife diseases*, 1981, *17*, 57-64.

CHAUHAN A.S., SRIVASTAVA C.B. & CHAUHAN B.S. Studies on the trematoda fauna of India, 6. Digenea: Schistosomatidae. A monographic aid to the identification of Indian schistosomes. *Journal of the Zoological Society of India*, 1974, *25*, 83-127.

CHEATUM E.L. *Dendritobilharzia anatinarum* n. sp., a blood fluke from the mallard. *Journal of Parasitology*, 1941, *27*, 165-170.

COMBES C. Corrélations entre les cycles sexuels des Amphibiens Anoures et des Polystomatidae (Monogenea). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Série D*, 1967, *264*, 1051-1052.

DÖNGES J. Schistosomatiden-Cercarien Süddeutschlands. Ein beitrag zur Kenntnis dermatitiserregender Trematodenlarven. *Zeitschrift fur Tropenmedicin und Parasitologie*, 1965, *16*, 305-321.

DORST J. Les migrations des oiseaux. Payot, Paris, 1956, 419 p.

DVORÁK J., VANACOVA S., HAMPL V., FLEGR J. & HORÁK P. Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences. *Parasitology*, 2002, *124*, 307-313.

ESJMONT L. Uber zwei Schistosomatidengattungen der Vögel. Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences et Lettres, Classe des Sciences Mathématiques Naturelles, Serie B : Sciences Naturelles, 1929, *2*, 389-403.

FARLEY J. A Review of the Family Schistosomatidae: excluding the Genus *Schistosoma* from Mammals. *Journal of Helminthology*, 1971, *45*, 289-320.

FREITAS M.G. & COSTA H.M.A. *Dendritobilharzia anatinarum* Cheatum, 1941 em pato doéstico, no Brasil. *Revista Brasileira Biologia*, 1972, *32*, 343-345.

HORÁK P. & KOLÁROVÁ L. Survival of bird schistosomes in mammalian lungs. *International Journal for Parasitology*, 2000, *30*, 65-68.

KHALIFA R. Studies on Schistosomatidae Looss, 1899 (Trematoda) of aquatic bird of Poland. I. On the cycle of *Bilharziella polonica* Kowalesski, 1895, with a discussion of the subfamily Bilharziellinae Price, 1929. *Acta Parasitologica Polonica*, 1972, *20*, 343-365.

KHALIFA R. Studies on Schistosomatidae Looss, 1899 (Trematoda) of aquatic bird of Poland. III. Notes on the morphology and life cycle of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Braun, 1901). *Acta Parasitologica Polonica*, 1976, *24*, 1-9.

KAHLIL L.F. Family Schistosomatidae Stiles and Hassal, 1898. *In:* Gibson A., Jones A. & Bray R.A., Keys to the trematoda, Vol. I. Cab publishing, London, 2002, 419-432.

KOLÁROVÁ L., HORÁK P. & SITKO J. Cercarial dermatitis in focus: schistosomes in the Czech Republic. *Helminthologia*, 1997, *34*, 127-139.

KOLÁROVÁ L., GOTTWALDOVÁ V., CECHOVÁ D. & SEVCOVÁ M. The occurence of cercarial dermatitis in Central Bohemia. *Zentrablatt und Hygiene*, 1989, *189*, 1-13.

KOWALEWSKI L. *Bilharziella polonica* sp. nov. (Studya helmintologiczne 3). *Rozprawy Wydzialu Matematyczno-Przyrodniczego Polskiej Akademii. Umiejetnosci Krakow*, 1895, *31*, 41-70.

LAL M.B. Studies on the Trematodes parasites of the birds. Part II. Morphology and Systematic position of some new Blood-Flukes of the family Schistosomidae. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 1937, *6*, 274-283.

LEITE A.C.R., COSTA H.M.A., COSTA J.O., GUIMARAES M.P. & LIMA W.S. The life cycle of *Dendritobilharzia anatinarum* Cheatum, 1941 (Trematoda, Schistosomatidae). *Memorias do Instituot Oswaldo Cruz*, 1982, *77*, 389-396.

LEVINE N.D., CLARK D.T. & HANON L.E. Encephalitis in a swan due to *Dendritobilharzia* sp. (Trematoda; Schistosomatidae). *Journal of Parasitology*, 1956, *42*, 496-500.

LITTLEWOOD D.T.J. & JOHNSTON D.A. Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology*, 1995, *111*, 167-175.

LIU Z. & BAI G. On bird schistosomes from Jilin Province: *Jilinobilharzia crecci* gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae: Bilharziellinae) with a discussion on the taxonomy of the subfamily of Bilharziinae. *Acta Zoologica Sinica*, 1976, *22*, 385-392.

LOCKYER A.E., OLSON P.D., OSTERGAARD P., ROLLINSON D., JOHNSTON D.A., ATTWOOD S.W., SOUTHGATE V.R., HORÁK P., SNYDER S.D., LE T.H., AGATSUMA T., MCMANUS D.P., CARMICHAEL A.C., NAEM S. & LITTLEWOOD D.T.J. The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of Schistosoma Weinland, 1858. *Parasitology*, 2003, *126*, 203-224.

MACKO J.K. Zur Revision der Systematik der Trematode *Dendritobilharzia anatinarum* Cheatum, 1941. *Helminthologia*, 1959, *1*, 133-137.

MARTORELLI S.R. *Dendritobilharzia rionegrensis* sp. nov. (Digenea Schistosomatidae). *Neotropica*, 1981, *27*, 171-177.

MEHRA H.R. A new distome *Enterohaematotrema* n. g. and new blood fluke *Hemiorchis bengalensis* n.sp. belonging to the family Spirorchiidae Stunkard, and a new species of the genus *Dendritobilharzia* Skrjabin and Zakharow belonging to the family Schistosomatidae Poche, with remarks on the evolution of the blood flukes. *Proceedings of the National Academy of Scicences of India*, 1940, *10*, 100-118.

PALM V. Ein Beitrag zur Helminthenfauna des Blesshuhns (*Fulica atra* L.) aus dem Raum von Postdam. *Acta Parasitologica Polonica*, 1965, *13*, 425-444.

PHILIPPE H. MUST a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nucleic Acids Resesarch*, 1993, *21*, 5264-5272

RIND S. *Dendritobilharzia pulverulenta* (Trematoda: Schistosomatidae) in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 1989, *16*, 215-220.

SULGOSTOWSKA T. Trematodes of the mute swan *Cygnus olor* from central and northern regions of Poland. *Acta Parasitologica Polonica*, 1972, *20*, 473-481.

SEPULVEDA M.S., SPALDING M.G., KINSELLA J.M., BJORK R.D. & MAC LAUGHLIN G.S. Helminths of the roseate spoonbill *Ajaiai ajaja*, in Southern Florida. *Journal of Helminthological Society of Washington*, 1994, *61*, 179-189.

SNYDER S.D. & LOKER E.S. Evolutionary relationships among the schistosomatidae (Platyhelminthes: Digenea) and an asian origin for *Schistosoma*. *Journal of Parasitology*, 2000, *86*, 283-288.

STUNKARD H.W. Induced gametogenesis in a Monogenetic Trematode, *Polystoma stellai* Vigueras, 1955. *Journal of Parasitology*, 1959, *45*, 389-394.

SZIDAT L. Die Parasiten des Hausgeflügels. 3 *Bilharziella polonica* Kow. ein im Blut Schmarotzender Trematode unserer Enten, seine Entwicklung und Ubertragung. *Archiv für Geflügelkude*, 1929, *3*, 78-87.

SZIDAT L. Uber Hautinfektionen bei Bluttrematoden insbesondere bei *Bilharziella polonica* Kow. *Archiv für Dermatologie und Syphilis*, 1930, *160*, 304-308.

ULMER M.J. & VAN DE VUSSE F.J. Morphology of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Braun, 1901) Skrjabin, 1924 (Trematoda: Schistosomatidae) with notes on secondary hermaphrodism in males. *Journal of Parasitology*, 1970, *56*, 67-74

Van de Vusse F.J. Host-Parasite relations of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Trematoda: Schistosomatidae) and anatids. *Journal of Parasitology*, 1979, *65*, 894-897.

VAN DE VUSSE F.J. A review of the genus *Dendritobilharzia* Skrjabin and Zakharow 1920 (Trematoda: Schistosomatidae). *Journal of Parasitology*, 1980, *66*, 814-822.

WILSON R.B., NEW J.C. & SCHOLTENS R.G. Granulomatous encephalitis caused by schistosomiasis in swans. *Jounal of America. Veterinar. Medical Association*, 1982, *181*, 1386-1387.

WOJCINSKI Z.W., BARKER I.K., HUNTER D.B. & LUMSDEN H. An outbreak of schistosomiasis in Atlantic brant geese, *Branta bernicola hrota*. *Journal of Wildlife Diseases*, 1987, *23*, 248-255.

YAMAGUTI S. Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates: Keigaku Publishing Co, Tokyo, 1971, Vol. 1, 1074 p.; Vol. 2, 349 pl.

ZBIKOWSKA E. Is there a potential danger of "swimmer's itch" in Poland? *Parasitology Research*, 2003, *89*, 59-62.

ZBIKOWSKA E. Infection of snails with bird schistosomes and the threat of swimmer's itch in selected Polish lakes. *Parasitology Research*, 2004, *92*, 30-35.

Reçu le 14 février 2006
Accepté le 30 mai 2006

5.3. Données moléculaires complémentaires :

Les échantillons correspondant aux œufs et adultes de *B. polonica* isolés au cours de notre étude sont regroupés dans le Tableau XI.

Tableau XI : Origines et références des échantillons de *B. polonica* et *D. pulverulenta* (œufs et adultes) isolés au laboratoire chez les différents oiseaux aquatiques.

Espèce	Hôte	Stade	Localisation	Localité	Référence BM
Bilharziella polonica	Colvert	Œuf	intestin	Vanault les Dames	KAL21, 24, 44
	Héron cendré	Adulte	foie	Der-Chantecoq	ARD*
	Sarcelle d'hiver	Œuf	intestin	Forêt d'Orient	JER2
		Œuf	foie	Der-Chantecoq	SAR*
	Grue cendrée	Adulte	foie	Marne	GRU4
	Poule d'eau	Œuf	intestin	Der-Chantecoq	POUL4*
	Fuligule morillon	Œuf	intestin	Der-Chantecoq	MORI7
	Cygne tuberculé	Œuf	mésentère	Der-Chantecoq	CYG14

***** caractérisation uniquement morphologique (échec séquençage)

Aucun site variable n'a été observé après séquençage du D2 (522 pb) pour les 11 taxons de *B. polonica* (Colvert, Héron cendré, Grue cendrée, Cygne tuberculé, Fuligule morillon et Sarcelle d'hiver), ainsi que pour les deux taxons ayant pour origine des furcocercaires émises par nos deux *Planorbarius corneus* et celles déposées dans GenBank (AF184265 et AY157240) à partir de vers adultes isolés d'*A. platyrhynchos*. En revanche la séquence obtenue de cercaires émises par un mollusque identifié *Planorbis planorbis* et déposée dans GenBank sous le binôme *B. polonica* (AF167088) diffère des autres séquences par un site nucléotidique.

Comme pour *T. regenti***,** la construction des arbres a été envisagée par une approche en Maximum de Vraisemblance, en Neighbor-Joining et en Maximum de Parcimonie (ITS-1 et ITS-2). La robustesse des branches a été testée par 500 bootstraps. Les paramètres nécessaires aux analyses ont été évalués à l'aide du programme Modeltest 3.1 puis inclus dans les programmes respectifs.

Pour le domaine ITS-2, l'alignement final comprend 13 taxons et sa taille est de 338 paires de bases, incluant les zones de délétions. Les séquences sont homologues à l'exception d'une séquence sur Colvert (FRA5) et d'une séquence sur Cygne (SCI1) qui possèdent chacune une base nucléotidique différente.

Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985) avec une correction Γ (=0.4994). La fréquence des bases est F(A) = 0.2785 ; F(C) = 0.2046 ; F(G) = 0.2159 et F(T) = 0.3010. Le taux de transitions / transversions est de 2.5476, la proportion de sites invariables est nulle. 69 sites sont informatifs en Parcimonie. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 33).

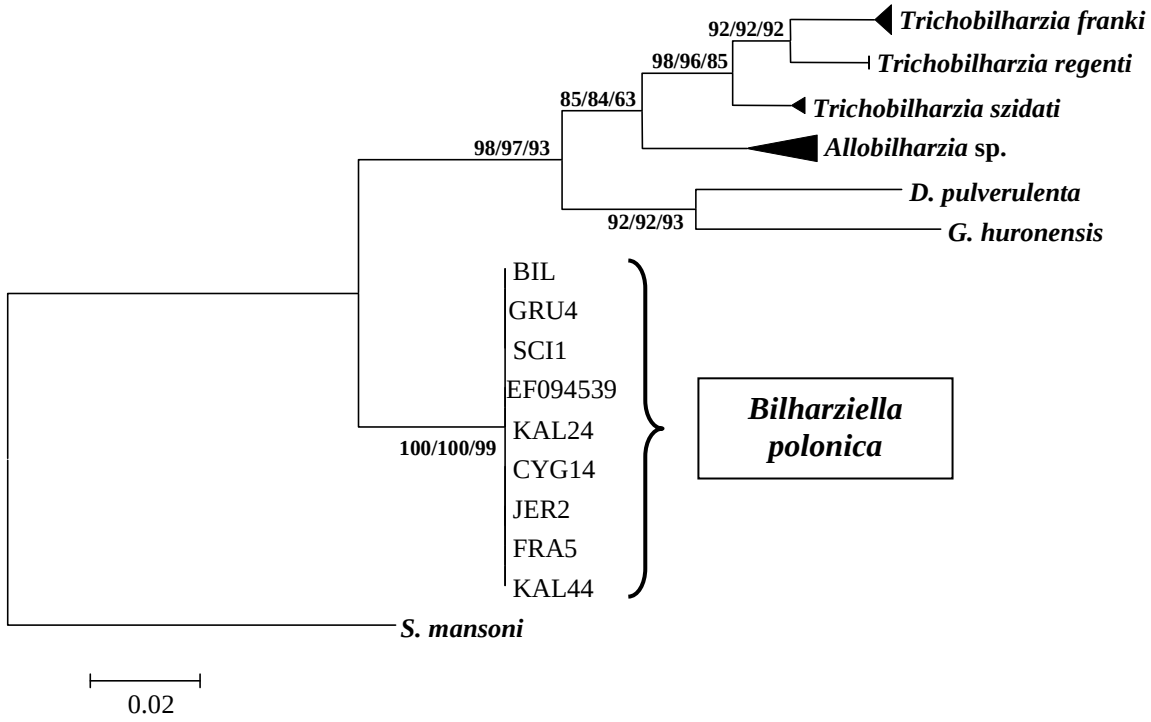


Figure 33 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance du domaine ITS-2 des différents œufs et adultes de *B. polonica*, présentant les positions respectives des différents Schistosomes aviaires. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

Enfin, en ITS-1 (1165pb), 11 variations intra-spécifiques sont présentes liées à la variabilité importante de ce domaine. Ces variations observées sont regroupées dans la Figure 34.

		49	57	418	496	620	818	1106	1110	1111	1113	1114
A. platyrhynchos	EF094539	G	T	C	G	T	C	G	C	G	T	T
	BIL4	•	G		A	C	•	C	•	A	G	G
Grus grus	GRU4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Anas crecca	JER2	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•
Cygnus olor	SCI1	C	•	•	•	C	•	•	A	A	•	G
	CYG14	•	•	T	•	•	T	•	•	•	•	•

Figure 34 : Alignement des séquences totales du domaine ITS-1 pour *B. polonica* retrouvé chez les hôtes définitifs, représentant les variations entre les différents haplotypes. Les bases identiques sont représentées par un point (•). Seuls les sites variables avec leur position donnée au-dessus sont présentés.

5.4. Cas particulier des Schistosomes aviaires chez le Cygne tuberculé (*Cygnus olor*)

Comme cela a été décrit dans les précédents chapitres, différents Schistosomes aviaires ont été isolés chez le Cygne tuberculé. Au niveau nasal, d'importantes infestations par *T. regenti* ont ainsi été montrées. Au niveau viscéral, des parasites appartenant aux espèces *Trichobilharzia franki*, *Bilharziella polonica* et *Dendritobilharzia pulverulenta* ont également été retrouvées seuls ou co-parasites chez un même hôte.

Sur la base des données moléculaires nous constatons en plus de la reconnaissance de *Trichobilharzia franki*, l'identification d'un taxon apparenté à *Allobilharzia visceralis*, que nous avons appelée *C. olor* sp. Pour nos analyses, nous avons intégré en D2 un nouvel échantillon d'*Allobilharzia visceralis* d'un Cygne chanteur (*Cygnus cygnus*) d'Islande transmis par le Professeur Karl Skírnisson, échantillon que nous avons soumis à notre propre protocole (extraction, amplification, séquençage). Ont été bien évidemment ajoutées les autres séquences disponibles d'*Allobilharzia visceralis* sur *Cygnus cygnus* et *C. columbianus* déposées par Kolářová *et al.*, 2006 et Brant, 2007.

Les analyses ont été réalisées pour le domaine D2 (457 pb) et la région comprenant le domaine ITS-2 combiné au domaine ITS-1 partiel (723 bp). L'alignement du domaine D2 pour les haplotypes *C. olor* sp. et *Allobilharzia visceralis* comprend 457 paires de bases. Les séquences des différents échantillons sont homologues pour chacun de ces deux haplotypes. 2 variations nucléotidiques existent entre ces deux taxons.

Pour l'analyse combinée ITS-2 / ITS-1 partiel, l'alignement comprend 723 paires de bases. Tout comme pour le domaine D2 les séquences appartenant à chacun des haplotypes ne présentent aucune variation entre elles, mais différent entre les deux taxons par 18 variations.

Les arbres phylogénétiques obtenus lors des différentes analyses ayant la même topologie, seule les paramètres et résultats de l'analyse en ITS seront représentés ici. Le modèle de substitution retenu pour les différentes analyses est le modèle Hasegawa, Kishino et Yano (HKY, Hasegawa et Otaki, 1985) avec une correction Γ (=0.4994). La fréquence des bases est F(A) = 0.2785 ; F(C) = 0.2046 ; F(G) = 0.2159 et F(T) = 0.3010. Le taux de transitions / transversions est de 2.5476, la proportion de sites invariables est nulle. La topologie des arbres est identique en NJ, ML et MP, et n'est pas modifiée en l'absence du taxon d'enracinement (Figure 35).

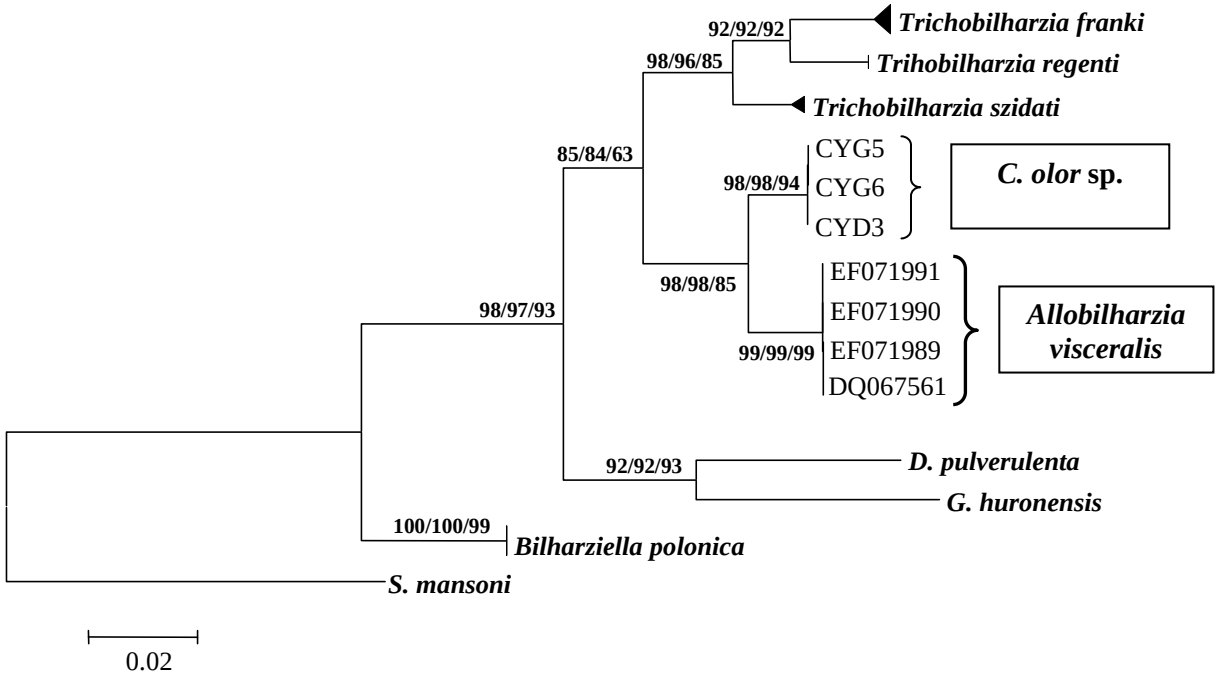


Figure 35 : Arbre phylogénétique en Maximum de Vraisemblance des domaines ITS-1 partiel et ITS-2 combinés présentant les positions respectives des différents Schistosomes aviaires. *Schistosoma mansoni* est le groupe externe d'enracinement. Les nombres présents au niveau des branches sont les valeurs de Bootstraps (500 répétitions) en Neighbor-Joining, Maximum de Vraisemblance et Maximum de Parcimonie.

Les quelques données morphologiques que nous avons pu recueillir sur un exemplaire mâle de *C. olor* sp. intéresse la bifurcation caecale (en avant de l'acetabulum), la réunion caecale en arrière du canal gynécophore, une vésicule séminale externe beaucoup plus longue que la vésicule séminale interne (Figure 36).

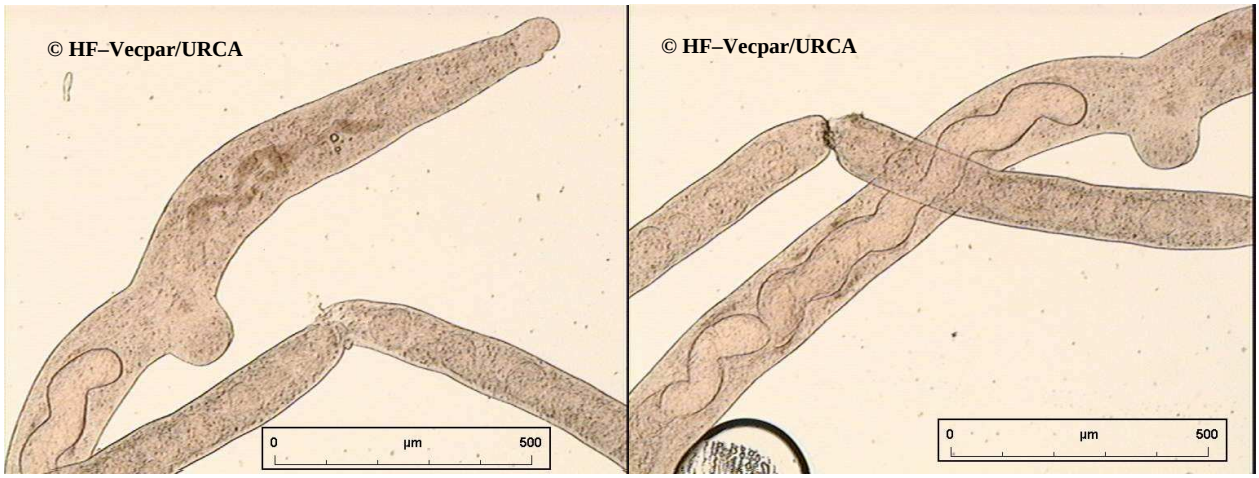


Figure 36 : Extrémité antérieure de l'exemplaire mâle *C. olor* sp.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

6.1. Bilharzies et mollusques

Les faibles prévalences de mollusques infestés par des furcocercaires ocellées observées se confirment sur le lac du Der-Chantecoq et sont semblables à celles décrites lors de précédentes études épidémiologiques en conditions naturelles (Kolářová *et al.*, 1992 ; Loy et Haas, 2001 ; Ferté *et al.*, 2005 ; Rudolfová *et al.*, 2005). Ces faibles taux n'influent toutefois pas sur le risque de dermatite cercarienne (Loy and Haas, 2001). En revanche le taux d'infestation sur les plans d'eau à vocation récréative en zone urbaine est plus élevé pouvant dépasser 1%, ce qui s'exprime de manière significative par des cas de dermatite cercarienne (Caumes *et al.*, 2003).

Au niveau des sites de prélèvements nous nous apercevons que l'aménagement artificiel des plans d'eau (Annecy, Strasbourg, Beauvais) conduit à l'absence ou à la disparition de certaines espèces de mollusques et en particulier pour *Lymnaea stagnalis*, connu pour son habitat préférentiel de type « eaux saumâtres », au profit de mollusques du genre *Radix*.

L'identification morphologique des mollusques du genre *Radix* sur les caractères morphologiques externes (forme de la coquille, taille) est pratiquement impossible, ces caractères pouvant dépendre des conditions environnementales (Pfenninger *et al.*, 2003). Aussi, l'approche moléculaire apparaît plus intéressante, mais il s'avère qu'un consensus est loin d'être accepté par tous du fait des méthodes employées. Bargues *et al*. (2001) utilisèrent l'ITS-2 pour établir la phylogénie des Lymnaeidae en Europe. Ils distinguent 6 espèces dans le genre *Radix* : *Radix auricularia*, *R. ampla*, R. *peregra* (= *ovata*; = *balthica*), R. *labiata*, R. *lagotis* et une espèce non précisée sur des exemplaires de Turquie. Si Pfenninger *et al.*, 2006 utilisent comme marqueur *Cox1* et regroupent les mollusques en six clades selon le principe des MOTU (Multiple Operational Taxa Unit), aucun nom d'espèce n'est attribué, tout en réfutant les mises en synonymies ou la priorité des taxons pour *peregra*, *ovata* et *balthica*. Il nous est donc apparu plus judicieux, dans une optique à visée épidémiologique, de privilégier l'identification de nos mollusques selon Bargues *et al*. (2001).

A l'exception de *Planorbarius corneus* sur le site du lac du Der-Chantecoq, les séquences des mollusques émettant des furcocercaires à ocelles pigmentés concernent 3 haplotypes, définis comme ceux de *Lymnaea stagnalis*, de *Radix auricularia* et *R. peregra*, mollusques également reconnus comme hôtes intermédiaires pour des Trématodes de type Diplostomidae, Echinostomidae ou Notocotylidae. Lors de nos investigations en France, aucun représentant des familles de Physidae et Bithyniidae n'a émis de furcocercaires à ocelles pigmentés, bien que Gerard signala pour la première fois en Bretagne, après dissection et non après émission, ce type de cercaire chez *Aplexa hypnorum* en 2004. Il serait intéressant de ramasser à nouveau ces mollusques dans le site considéré et de privilégier des tests d'émission aux dissections afin de s'affranchir de tout

phénomène éventuel d'inhibition. Actuellement, les seuls membres des Physidae reconnus comme hôte intermédiaire ont été identifiés en Amérique du nord.

Pour les espèces du genre *Trichobilharzia*, en Europe, la spécificité Lymnaeidae – parasite fut considérée comme très étroite, voire exclusive par de nombreux auteurs : les couples retenus sont *T. szidati – L. stagnalis*, *T. franki – R. auricularia*, *T. regenti – R. ovata* sensu lato. Aussi, en s'appuyant sur ce concept, des furcocercaires à ocelles pigmentés observées chez d'autres espèces de mollusques furent assimilées d'emblée à de nouvelles espèces de Trichobilharzies (Gerard, 2004). Toutefois, en 2001, Koch montra l'éventualité d'un développement, dans une proportion moindre (10%), de *T. franki* chez *R. ovata* sensu lato, malgré son tropisme naturel pour *R. auricularia*.

Nos résultats confirment la possibilité pour une seule espèce de mollusque, en conditions naturelles (lac d'Annecy), de jouer le rôle d'hôte intermédiaire pour plusieurs parasites : *R. peregra* (identifié moléculairement) est capable d'émettre des haplotypes appartenant aux espèces *T. regenti*, *T. franki* ainsi que deux nouveaux haplotypes inconnus (*Trichobilharzia* sp.1 et *Trichobilharzia* sp.2). Ces résultats sont comparables à l'identification récente d'un haplotype de *T. franki* chez une *Lymnaea stagnalis* de Pologne (Rudolfová *et al.*, 2005), suggérant une grande prudence quant à la reconnaissance d'une espèce parasite sur la simple reconnaissance de l'hôte intermédiaire.

Par le séquençage systématique de nos différents échantillons, nous nous sommes affranchis des difficultés d'identification et de diagnose des furcocercaires sur des critères strictement morphologiques (chaetotaxie) et de celles des mollusques du genre *Radix* (observation de l'aspect externe). Toutefois la mise en œuvre d'une telle approche moléculaire semble illusoire dans le cadre d'une surveillance épidémiologique à grande échelle. Comme nous l'avons brièvement évoqué dans notre travail, le développement de techniques telle que la RFLP en analyse de routine semble donc plus adapté. Pour cela, le choix des marqueurs et des enzymes devra prendre en compte le maximum de taxons disponibles et être remis en question lors de la mise en évidence de nouveaux haplotypes.

6.2. Bilharzies et hôtes définitifs

L'inventaire faunistique a été envisagé sur 16 espèces hôtes dont la majorité d'entre elles appartiennent au genre *Anas*. C'est au sein de ce genre que furent retrouvés et répertoriés les principaux hôtes définitifs de Schistosomes aviaires en Europe. Ce biais d'échantillonnage est en partie lié aux effectifs importants des espèces de ce genre, mais surtout aux pressions cynégétiques dont celles-ci font l'objet en tant qu'espèce gibier [Colvert (*Anas platyrhynchos*)]. L'accès à des

animaux retrouvés morts nous a donc permis de procéder à l'examen de quelques animaux protégés, et donc plus rarement étudiés, tels que le Cygne tuberculé (*Cygnus olor*), le Héron cendré (*Ardea cinerea*), le Grèbe huppé (*Podiceps cristatus*) ou la Grue cendrée (*Grus grus*).

En Europe, la présence de *Dendritobilharzia pulverulenta* fut rapportée chez des Anatidés (*A. platyrhynchos*, *A. crecca*, *A. querquedula*, *Aythya ferina*) par Sulgostowska, 1960. Par la suite, celui-ci fut principalement rapporté chez le Cygne.

En France, le spectre d'hôte de *Bilharziella polonica* observé par Bayssade-Dufour *et al*. (2006), compte dorénavant 4 nouveaux hôtes : la Sarcelle (*Anas crecca*), le morillon (*Aythya fuligula*) et la poule d'eau (*Gallinula chloropus*), fréquemment répertoriés (Sulgostowska, 1960), mais aussi la Grue cendrée (*Grus grus*). La seule mention de parasites retrouvés chez la Grue est celle de Gottschalk et Prange en 2002, dont les analyses se révélèrent négatives en schistosomes aviaires. Pour la première fois, nous avons pu observer la présence d'œufs caractéristiques de *B. polonica* chez une femelle (in utero) isolée d'un Cygne (*Cygnus olor*), ou seuls au niveau de la muqueuse caecale. A partir de ces échantillons, les analyses moléculaires complémentaires réalisées sur les espaces transcrits internes ITS-1 et ITS-2 de *Bilharziella polonica* sont en faveur d'une seule et même espèce : homologie à 100% de tous les ITS-2, quelques sites variables pour les ITS-1 et conservation d'un haplotype homologue à l'ensemble des échantillons pour le domaine D2.

Quatre hôtes sont reconnus en France comme hébergeant *T. regenti* ; le Colvert (*A. platyrhynchos*) et le Fuligule morillon (*Aythya fuligula*), signalés précédemment par Rudolfová *et al.*, 2002 et Picard et Jousson, 2001, mais aussi le Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) et le Harle bièvre (*Mergus merganser*). La seule proposition d'un hôte définitif sur des résultats d'infestations expérimentales est fréquente. Si pour *T. franki*, un seul hôte définitif type, *A. platyrhynchos* a ainsi été proposé, nous signalons pour la première fois la présence de cette espèce en conditions naturelles chez d'autres Ansériformes : le Cygne tuberculé (*C. olor*), le Colvert (*A. platyrhynchos*), le Fuligule morillon (*A. fuligula*) et la Sarcelle d'hiver (*A. crecca*). Les hôtes définitifs identifiés pour *T.szidati* en France sont la Sarcelle d'hiver, précédemment inventoriée en Europe (Rudolfová *et al.*, 2007), mais aussi un nouvel hôte, le Souchet (*A. clypeata*).

Parmi ces hôtes définitifs, certains semblent plus « aptes » à assurer le rôle principal de réservoir. C'est le cas du Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) vis-à-vis de *T. regenti* : forte prévalence et présence d'un nombre élevé d'œufs au niveau de la muqueuse nasale. Cette notion de réservoir efficace est accentuée avec l'augmentation des populations, phénomène observé en France pour cette espèce sur l'ensemble des plans d'eau.

6.3. Vers de nouveaux genres et espèces parmi les Schistosomes aviaires

L'approche moléculaire envisagée dans notre étude et les résultats obtenus quant à la diversité des haplotypes en fonction des domaines étudiés nous permet de dégager les points suivants :

- Le domaine D2 et, à un degré moindre, l'ITS-2 semblent être des marqueurs de niveau spécifique (homologie égale ou proche de 100% pour un même taxon ou une même espèce).
- L'ITS-1 est un marqueur de niveau populationnel (nombre de sites variables plus important pour une même espèce).

Sur la base de ces caractères moléculaires, nous pouvons supposer l'existence de nouvelles espèces viscérales chez les Oies cendrées (*A. anser*) correspondant aux trois nouveaux haplotypes observés : *Anser anser* Aa1, Aa2, Aa3 (Figure 25), dont deux forment des clades extérieurs aux genres *Trichobilharzia* et *Allobilharzia*. Ceci semblerait évoquer la présence de deux nouveaux genres. Le statut des parasites viscéraux du Cygne, referencés *C. olor* sp, est actuellement difficile à interpréter. En effet, les adultes isolés présentent une réunion caecale située en arrière du canal gynécophore, caractère morphologique reconnu pour le genre *Allobilharzia*, dont la seule espèce actuellement décrite est *A. visceralis* isolée sur *Cygnus cygnus*. Cependant, la position en groupe frère du genre *Allobilharzia* des haplotypes correspondant à nos échantillons isolés sur *C. olor* semble en faveur d'une nouvelle espèce. Les résultats obtenus sont toutefois insuffisants pour statuer actuellement sur le fait qu'il s'agisse d'une nouvelle espèce au sein du genre *Allobilharzia*, d'une espèce appartenant à un nouveau genre, ou d'un topotype de *Trichobilharzia filiformis* (Szidat, 1938), espèce décrite sur *Cygnus olor* et considérée actuellement comme non valide par le manque d'éléments relatifs à sa description.

Les analyses du domaine D2 et des espaces transcrits internes (ITS-2 et ITS-1) des différentes Trichobilharzies nasales montrent la présence de deux branches distinctes. Si l'ensemble des échantillons est défini moléculairement comme appartenant à l'espèce *T. regenti*, la morphologie des œufs isolés chez le Souchet (*A. clypeata*) diffère des autres oeufs retrouvés chez le Colvert ou chez le Cygne (Figure 26). Des œufs présentant des caractères morphologiques équivalents (Figure 37) ont par ailleurs été observés en Afrique (Fain, 1955c; Fain, 1955d; Fain, 1955e; Fain, 1956b; Fain, 1956a; Fain, 1959) et en Australie (Islam, 1986), lors d'isolement d'autres espèces de Trichobilharzies nasales chez des oiseaux. La présence, en France, de ces espèces précédemment décrites pourrait donc être envisagée chez le Souchet, espèce migratrice hivernant sur le continent africain. Cette hypothèse semble confirmée par l'absence, en Europe, de mollusques émettant des cercaires dont l'haplotype correspondrait à celui obtenu pour les œufs retrouvés dans les cavités nasales du Souchet.

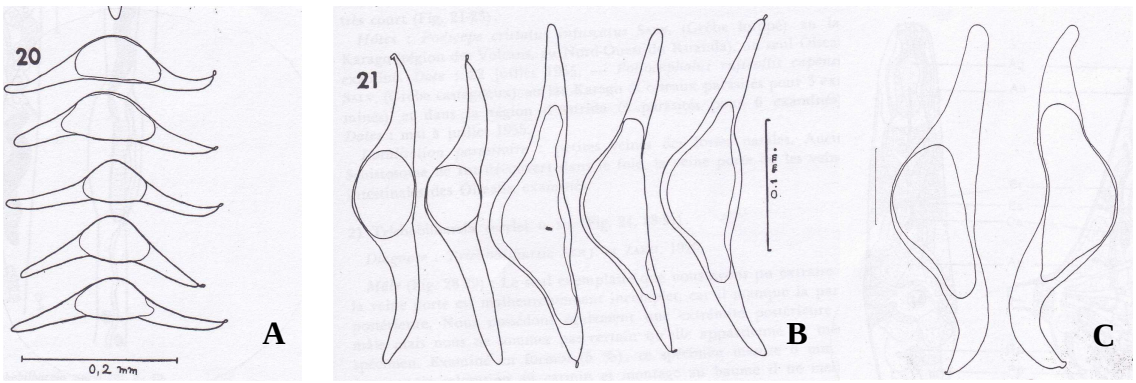


Figure 37 : Œufs de Trichobilharzies nasales : A- *T. spinulata* ; B- *T. aureliani* ; C- *T. arcuata*

6.4. Les acteurs impliqués dans la dermatite cercarienne

Sur les sites où une enquête malacologique et des autopsies d'oiseaux aquatiques ont été envisagées conjointement, les acteurs nécessaires à la réalisation du cycle des parasites n'ont pas été systématiquement identifiés.

Sur le site d'Annecy, les agents prouvés de dermatite cercarienne, les furcocercaires de *T. regenti* et de *T. franki* sont émises par des *Radix peregra*. Les parasites adultes de *T. regenti* ont été identifiés chez les oiseaux sédentaires ou de passage sur le site : Colvert, Cygne tuberculé, Harle bièvre (homologies à 100% de tous les haplotypes). Cependant, aucun œuf ou ver adulte correspondant aux haplotypes « *franki* sur *peregra* » et *Trichobilharzia* sp1 et sp2 n'ont actuellement été retrouvé. Le seul haplotype homologue à 100% de celui de « *franki* sur *peregra* », retrouvé en France, est celui obtenu à partir de vers viscéraux d'un Fuligule morillon isolé sur le lac du Der-Chantecoq.

Sur le site de Beauvais, les furcocercaires de *T. franki*, agent reconnu de dermatite cercarienne, ont été isolées sur *Radix auricularia* et les vers adultes retrouvés chez des Colverts. Si la présence de *T. regenti* a été confirmée dans leurs cavités nasales sur un grand nombre d'individus, aucune furcocercaire de cette espèce n'a pour hôte intermédiaire des mollusques du plan d'eau.

Sur le site du lac du Der-Chantecoq, tous les acteurs ont été identifiés pour l'accomplissement du cycle de *T. szidati* (furcocercaires sur *L. stagnalis* ; vers adultes chez le Souchet, la Sarcelle et fortement suspectés chez le Colvert) et de *Bilharziella polonica* (furcocercaires sur *Planorbarius corneus*), vers adultes chez des Anatidés, chez le Cygne tuberculé, chez le héron cendré et chez la Grue cendrée). En revanche aucun mollusque n'a été retrouvé porteur de furcocercaire de *T. regenti* représenté chez les oiseaux par un haplotype unique (homologie à 100% pour le domaine D2 et l'ITS-2).

6.5. Diversité du genre *Trichobilharzia*

6.5.1. Sur des caractères morphologiques

Avec plus de 40 espèces décrites, le genre *Trichobilharzia* est le plus important au sein des Schistosomatidae (Horák *et al.*, 2002). Toutefois, parmi toutes ces espèces, seules quelques unes sont suffisamment documentées pour permettre des comparaisons à la fois morphologiques et moléculaires. Ainsi, il semble aujourd'hui avéré que la diagnose basée sur la seule connaissance des cercaires, de la morphologie des œufs ou de la spécificité d'hôte est insuffisante à l'établissement d'un nouveau genre, ou d'une nouvelle espèce. Le groupe des « ocellata » en est un parfait exemple avec, dans un passé proche, la mise en synonymie ou l'exclusion de nombreuses espèces préalablement décrites sur des caractères insuffisants, et l'abandon de *T. ocellata* au profit de *T. szidati* (Rudolfová *et al.*, 2005).

En Europe, sur la base de ces caractères morphologiques, 7 espèces sont présentes : *T. kossarewi* Skrjabin et Zakharow, 1920 ; *T. kowalewskii* (Ejsmont, 1929) ; *T. filiformis* (Szidat, 1938); *T. szidati* Neuhaus, 1952 ; *T. franki* Müller et Kimmig, 1994; *T. regenti* Horák, Kolářová et Dvořák, 1998 ; *T. salmanticensis* Simon Martin et Simon Vicente, 1999. Malheureusement, l'analyse de ces caractères reste difficile par l'isolement complexe de fragments d'adultes chez l'hôte définitif, et des réserves peuvent être posées pour certaines de ces espèces, par l'insuffisance de données ou l'absence de comparaison avec des espèces pré-existantes.

6.5.2. Sur des caractères moléculaires

Depuis les années 1990, l'avènement de la biologie moléculaire a permis de clarifier les critères d'appartenance à un genre, par l'apport de données complémentaires à la morphologie. Ainsi, de nombreuses études ont montré l'intérêt de l'ADN ribosomal pour des analyses en phylogénie et en systématique des vers plats (Monogènes, Cestodes et Trématodes) (Littlewood, 2001).

Sur la base des données européennes, nous observons que les représentants du genre *Trichobilharzia*, goupe frère de l'ensemble (*Allobilharzia – C. olor* sp) se répartissent en 6 branches:

- trois branches comprenant les différents haplotypes des espèces *T. franki*, *T. szidati* et *T. regenti*, espèces parfaitement documentées pour la morphologie (œufs, cercaires et vers adultes)

- deux branches composées par les haplotypes EU413964/74 (EAN35) et EU413961/71 (EAN17), séquences de furcocercaires à ocelles pigmentés isolées sur *R. peregra*
- et une branche composée d'haplotypes obtenus à partir d'œufs isolés sur le canard siffleur, *A. penelope* (Rudolfová *et al.*, 2007).

Pour ces trois dernières branches, les seules données moléculaires évoquent la reconnaissance de nouvelles espèces. L'isolement et l'examen morphologique d'adultes présentant les mêmes haplotypes sont nécessaires pour asseoir leur statut réel de nouvelles espèces.

Pour la branche des *T. szidati*, deux haplotypes principaux ont été isolés : le premier comprend des cercaires isolées sur *Lymnaea stagnalis* en France, Allemagne, Pays-Bas, Pologne et République Tchèque, et sur des oiseaux aquatiques appartenant aux espèces *A. clypeata* et *A. crecca* provenant de France et de Pologne ; le second haplotype correspond à des adultes et œufs isolés sur *A. platyrhynchos*, retrouvés en Pologne et République Tchèque, en l'absence de tout haplotype sur cercaire.

Pour *T. regenti*, les variations morphologiques retrouvées au niveau des œufs semblent confirmées par la présence d'un haplotype particulier (en D2 et ITS-1) pour les œufs et adultes isolés chez *A. clypeata* en France et en Pologne. Cet haplotype diffère de celui présent chez les autres oiseaux aquatiques (*A. platyrhynchos*, *Mergus merganser*, *A. fuligula* et *C. olor*) isolés en France, Pologne, République Tchèque et Suisse et pour les cercaires isolées sur *R. peregra / ovata* dans ces mêmes pays.

Enfin, dans la branche de *T. franki*, deux principaux haplotypes sont formés par, d'une part, les cercaires isolées sur *R. auricularia* et les œufs et adultes isolés sur *A. platyrhynchos* et *C.olor* en Europe, et d'autre part, les cercaires isolées sur *R. peregra / ovata* et les œufs et adultes isolés sur *A. crecca* et *A. fuligula* en France.

Les analyses en biologie moléculaire confirment donc la présence de nombreux haplotypes différents dans le genre *Trichobilharzia*, y compris au sein d'une même espèce. Ils tendent également à montrer, pour les espèces actuellement disponibles, le caractère monophylétique du genre *Trichobilharzia*. Toutefois, afin de pouvoir statuer plus précisément sur ce point, il sera nécessaire, dans le futur, d'obtenir plus de données concernant les espèces Nord-américaines et africaines et de clarifier le statut des espèces décrites dans le passé (*T. filiformis*, *T. salmanticencis*)

Enfin, si ces résultats permettent d'envisager la présence de tous les acteurs du cycle sur un site particulier, ils ne permettent pas de conclure sur l'éventualité d'une spécificité haplotypique pour une localisation donnée.

6.6. Perspectives : agents de dermatite et implications épidémiologiques

Le nombre d'espèces recensées et identifiées appartenant aux Schistosomes aviaires est important, et celui-ci ne cesse d'augmenter par les recherches de plus en plus nombreuses menées actuellement à travers le monde. Toutefois, l'identification et la classification de ces espèces restent difficiles, et les anciennes descriptions sont parfois insuffisamment documentées. C'est pourquoi aujourd'hui, il semble établit que l'apport de données morphologiques, moléculaires et épidémiologiques précises sont essentielles à l'établissement de nouveaux genres ou de nouvelles espèces.

Par ailleurs, des études futures devront tenter d'établir les risques réels pour l'Homme. En effet, si l'implication de certaines espèces telles que *T. regenti*, *T. szidati*, *T. franki* ou *B. polonica* semble établie, le rôle pathogène des espèces nouvellement décrites reste à déterminer.

Afin de mieux comprendre les cycles de développement de ces parasites (hôtes manquants) et permettre ainsi le contrôle des risques liés à ces différents agents, les études épidémiologiques débutées lors de notre travail devront être poursuivies. De nouvelles investigations devront également être menées sur de nouveaux sites, notamment sur les lieux d'hivernage et les voies de migration des oiseaux. Des collaborations se mettent actuellement en place avec d'autres scientifiques intéressés par cette thématique en Europe, Islande et Amérique du Nord.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALLERBERGER, F., WOTZER, G., DIERICH, M. P., MORITZ, C., FRITSCH, P. et HAAS, W.
Auftreten von Badedermatitis in Tirol.
Immun. Infekt. 1994; 22 (1): 30-2.

ALLGOWER, R. et EFFELSBERG, W.
[Swimmers' dermatitis in an excavation pool--an incentive for the status analysis of the water and for the preparation of an ecology-friendly utilization concept].
Offentl. Gesundheitswes. 1991; 53 (3): 138-43.

APPLETON, C. C.
Schistosome dermatitis--an unrecognized problem in South Africa?
S. Afr. Med. J. 1984; 65 (12): 467-9.

APPLETON, C. C. et LETHBRIDGE, R. C.
Schistosome dermatitis in the Swan Estuary, Western Australia.
Med. J. Aust. 1979; 1 (5): 141-5.

AZIMOV, S., A., et IBADULLAEV, F.
Patomorfologicheskie izmeneniia pri fastsioleze zhvachnykh.
Veterinariia 1970; 8: 63-5.

BARGUES, M. D., VIGO, M., HORÁK, P., DVOŘÁK, J., PATZNER, R. A., POINTIER, J. P., JACKIEWICZ, M., MEIER-BROOK, C. et MAS-COMA, S.
European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiases, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences.
Infect. Genet. Evol. 2001; 1 (2): 85-107.

BASCH, P., F., LIE, K., J. et HEYNEMANN, D.
Antagonistic interaction between strigeid and schistosome sporocysts within a snail host.
J. parasitol. 1969; 55: 753-58.

BAUGH, S.C.
Contributions to our knowledge of digenetic TrematodesVI.
Zeitschrift fur. Parasitenkunde, 1963, *22*: 303-315.

BAYSSADE-DUFOUR, C., MARTINS, C., VUONG, P.N.
Histopathologie pulmonaire d'un modèle mammifère et dermatite cercarienne humaine.
Med. Mal. Infect. 2001; 31: 713-722.

BAYSSADE-DUFOUR, C., JOUET, D., RUDOLFOVÁ, J., HORÁK, P. et FERTE, H.
Seasonal morphological variations in bird Schistosomes.
Parasite 2006; 13 (3): 205-14.

BAYSSADE-DUFOUR, C., VUONG, P. N., RENE, M., MARTIN-LOEHR, C. et MARTINS, C.
Lésions viscérales de mammifères et oiseaux, exposés aux agents de dermatite cercarienne humaine.
Bull Soc Pathol Exot 2002; 95 (4): 229-37.

BELFAIZA, M., ABROUS, M., RONDELAUD, D., MONCEF, M. et DREYFUSS, G.
The use of tetraphyll as food for snails increases the intensity of cercarial shedding in *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica*.
Parasitol. Res. 2004; 94 (2): 86-90.

BLAIR, D. et ISLAM, K. S.
The life-cycle and morphology of *Trichobilharzia australis* n.sp. (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*.
Syst. Parasitol. 1983; 5: 89-117.

BLAIR, D. et OTTESEN, P.
Nasal schistosomiasis in australian Anatids.
J. Parasitol. 1979; 65 (6): 982-984.

BLAŽOVÁ, K. et HORÁK, P.
Trichobilharzia regenti: the developmental differences in natural and abnormal hosts.
Parasitol. Int. 2005; 54 (3): 167-72.

BRACKETT, S.
Pathology of Schistosome dermatitis.
Archives of Dermatology and Syphilology 1940: 410-418.

BRANT, S. V.
The occurrence of the avian schistosome *Allobilharzia visceralis* Kolářová, Rudolfová, Hampl et Skírnisson, 2006 (Schistosomatidae) in the tundra swan, *Cygnus columbianus* (Anatidae), from North America.
Folia Parasitol. (Praha) 2007; 54 (2): 99-104.

BRANT, S. V., MORGAN, J. A., MKOJI, G. M., SNYDER, S. D., RAJAPAKSE, R. P. et LOKER, E. S.
An approach to revealing blood fluke life cycles, taxonomy, and diversity: provision of key reference data including DNA sequence from single life cycle stages.
J. Parasitol. 2006; 92 (1): 77-88.

BRUMPT, E.
Prurit et dermatites produites chez les nageurs par des cercaires de mollusques d'eau douce.
Cr. Acad. Sci. Paris 1931; 193: 253-255.

BUSH, A., FERNANDEZ, J., ESCH G. et SEED, J-R.
Parasitism : the diversity and ecology of animal parasites.
Cambridge : Cambridge University press ; 2001.

BYKHOVSKAJA-PAVLOSKAJA , I.E. et RIJIKOV, K.M.
[Schistosomes (Schistosomatidae Looss, 1899) from anatids in Yakutiya.]
Parazitologiceskij Sbornik Zoologiceskovo Instituta Akademii Nauch SSSR, 1958, *18*,283-294.

CANARIS, A.G., MENA, A.C. et BRISTOL, J.R.
Parasites of waterfowl from southwest Texas: III. The green-winged teal *Anas crecca.*
Journal of Wildlife diseases, 1981, *17*, 57-64.

CANESTRI-TROTTI, G., FIORAVENTI, M.L. et PAMPIGLIONE, S.
Cercarial dermatitis in Italy.
Helminthology (2001); 38:245.

CARRE-VIGREUX, S.
Identification moléculaire des agents de la dermatite cercarienne : application à un foyer en Champagne-Ardenne.
Th. D. : Pharm. : Reims : 2005

CAUMES, E., FELDER-MOINET, S., COUZIGOU, C., DARRAS-JOLY, C., LATOUR, P. et LEGER, N.
Failure of an ointment based on IR3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) to prevent an outbreak of cercarial dermatitis during swimming races across Lake Annecy, France.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 2003; 97 (2): 157-63.

CHANOVÁ, M. et HORÁK, P.
Terminal phase of bird schistosomiasis caused by *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) in ducks (*Anas platyrhynchos f. domestica*).
Folia Parasitol. (Praha) 2007; 54 (2): 105-7.

CHAUHAN, A.S., SRIVASTAVA, C.B. et CHAUHAN,B.S.
Studies on the trematoda fauna of India, 6. Digenea: Schistosomatidae. A monographic aid to the identification of Indian schistosomes.
Journal of the Zoological Society of India, 1974, *25*, 83-127.

CHEATUM, E. L.
Dendritobilharzia anatinarum n. sp., a blood fluke from the mallard.
Journal of Parasitology 1941; 27: 165-170.

CLEGG, J. A.
In Vitro Cultivation of *Schistosoma Mansoni*.
Exp Parasitol 1965; 16: 133-47.

COMBES, C.
Corrélations entre les cycles sexuels des Amphibiens Anoures et des Polystomatidae (Monogenea).
Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Série D, 1967, *264*, 1051-1052.

COMBES, C.
Interactions durables: Ecologie et évolution du parasitisme.
Masson :Paris, 1995

COMBES, C., ALBARET, J.-L., BARTOLI, P., BAYSSADE-DUFOUR, C., DEBLOCK, S., DURETTE-DESSET, M.-C., GABRION, C., JOURDANE, J., LAMBERT, A., LÉGER, N., MAILLARD, C., MATRICON, M., NASSI, H., PREVOT, G., RICHARD, J. et THERON, A.
Atlas mondial des cercaires.
Mem. Mus. Natl. Hist. Nat. Paris, serie A 1980; 115: 235.

COMBES, C., BAYSSADE-DUFOUR, C. et CASSONE, J.
Sur l'imprégnation et le montage des cercaires pour l'étude chétotaxique.
Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1976; 51 (3): 399-400.

CORT, W. W.
Further Observations on Schistosome Dermatitis in the United States (Michigan).
Science 1928; 68 (1764): 388.

CORT, W. W.
Studies on schistosome dermatitis.
Am. J. Hyg. 1936; 52: 349-369.

CORT, W. W.
Studies on schistosome dermatitis XI. Status of knowledge after more than 20 years.
Am. J. Hyg. 1950; 52 (3): 251-307.

DE GENTILE, L., PICOT, H., BOURDEAU, P., BARDET, R., KERJAN, A., PIRIOU, M., GUENNIC, A.L., BAYSSADE-DUFOUR, C., CHABASSE, D., MOTT, K.E., LE GUENNIC, A.
Cercarial dermatitis in Europe: a new public health problem?
Bull. World. Health. Organ. 1996; 74(2): 159-163.

DÖNGES, J.
Double infection experiments with echinostomatids (Trematoda) in *L. stagnalis* by implantation of rediae and exposure to miracidia.
Int. J. parasitol. 1972; 2: 409-23.

DÖNGES, J.
Schistosomatiden-Cercarien Süddeutschlands. Ein beitrag zur Kenntnis dermatitiserregender Trematodenlarven.
Zeitschrift fur Tropenmedicin und Parasitologie, 1965, *16*, 305-321.

DORST, J.
Les migrations des oiseaux.
Payot , Paris, 1956, 419 pp.

DREYFUSS, G., VIGNOLES, P. et RONDELAUD, D.
Variability of *Fasciola hepatica* infection in *Lymnaea ovata* in relation to snail population and snail age.
Parasitol. Res. 2000; 86 (1): 69-73.

DVOŘÁK, J., VANACOVA, S., HAMPL, V., FLEGR, J. et HORÁK, P.
Comparison of european *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences.
Parasitology 2002; 124 (Pt 3): 307-13.

EKLU-NATEY, D. T., AL-KHUDRI, M., GAUTHEY, D., DUBOIS, J. P., WÜEST, J., VAUCHER, C. et HUGGEL, H.
Epidemiologie de la dermatite des baigneurs et morphologie de *Trichobilharzia* cf. *ocellata* dans le lac Léman.
Revue suisse Zool. 1985; 92: 939-953.

ESJMONT, L.
Uber zwei Schistosomatidengattungen der Vögel.
Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences et Lettres, Classe des Sciences Mathématiques Naturelles, Serie B: Sciences Naturelles, 1929, 2, 389-403.

FAIN, A.
Sur une furcocercaire du groupe Ocellata produisant experimentalement la dermatite des nageurs a Astrida (Ruanda-Urundi).
Ann. Soc. Belg. Med. Trop. (1920) 1955a; 35 (6): 701-7.

FAIN, A.
Une nouvelle bilharziose des oiseaux: la trichobilharziose nasale; remarque sur l'importance des schistosomes d'oiseaux en pathologie humaine; note préliminaire.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop. (1920) 1955b; 35 (3): 323-7.

FAIN, A.
Un nouveau schistosome du Cormoran au Ruanda-Urundi (Congo Belge) - *Ornithobilharzia baeri* n. sp.
Acta Trop. 1955c; 12 (4): 356-60.

FAIN, A.
Recherche sur les Schistosomes d'oiseaux au Ruanda-Urundi (Congo belge). Decouverte d'une nouvelle bilharzie aviaire: la Trichobilharzie nasale, et description de Schistosomes nouveaux. Note préliminaire.
Revue Zoologique Botanique africaine 1955d; 51: 373-387.

FAIN, A.
Etude sur les schistosomes d'oiseaux au Ruanda-Urundi (Congo Belge); un nouveau schistosome du Tantale ibis (*Ibis ibis* Lin) *Gigantobilharzia tantali* n. sp.
Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1955e; 30 (4): 321-8.

FAIN, A.
Les Schistosomes d'Oiseaux du genre *Trichobilharzia* Skrjabin et Zakharow, 1920 au Ruanda-Urundi.
Extrait de la Revue de Zoologie et de Botanique Africaines 1956a; Vol. Liv. Fasc 1-2: 147-178.

FAIN, A.
Les Schistosomes d'oiseaux du genre *Trichobilharzia* Skrjabin et Zakharow, 1920 au Ruanda-Urundi.
Rev. Zool. Bot. Afr. 1956b; 54: 147-178.

FAIN, A.
Nasal trichobilharziasis: a new avian schistosomiasis.
Nature 1956c; 177 (4504): 389.

FAIN, A.
Un nouveau schistosome du genre *Trichobilharzia* dans les fossels nasales du Canard nain.
Revue Zoologique Botanique Africaine 1959; 60: 227-232.

FALTYNKOVA, A., NASINCOVA, V. et KABLASKOVA, L.
Larval trematodes (Digenea) of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.), (Gastropoda, Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification.
Parasite 2007; 14 (1): 39-51.

FARLEY, J.
A review of the family Schistosomatidae: excluding the genus *Schistosoma* from mammals.
J Helminthol 1971; 45 (4): 289-320.

FERTÉ, H., DEPAQUIT, J., CARRE, S., VILLENA, I. et LEGER, N.
Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern France: molecular evidence.
Parasitol. Res. 2005; 95 (2): 150-4.

FRAGA DE AZEVEDO, J. et DO CARMO M. DE MEIDEROS, L.
Bases pour la classification des Gastéropodes pulmonés d'eau douce. Sur la nécessité d'uniformiser les méthodes de classification.
Act. Trop. 1959 ; 16(1) : 38-62.

FREITAS, M. G. et COSTA, H. M.
Dendritobilharzia anatinarum Cheatum, 1941 em pato domestico, no Brasil (Trematoda, schistosomatidae).
Rev. Bras. Biol. 1972; 32 (3): 343-5.

GAY, P.
La dermatite cercarienne en Franche-Comté (1994-1996); approche épidémiologique, clinique et diagnostique.
Th. D. : Méd. : 1997

GAY, P., BAYSSADE-DUFOUR, C., GRENOUILLET, F., BOUREZANE, Y. et DUBOIS, J. P.
Etude expérimentale de dermatites cercariennes provoquées par *Trichobilharzia* en France.
Méd.Mal.Infect. 1999; 29: 629-37.

GERARD, C.
First occurrence of Schistosomatidae infecting *Aplexa hypnorum* (Gastropoda, Physidae) in France.
Parasite 2004; 11 (2): 231-4.

GOLO, D., ACCORDINI, A., CONSOLARO, S., MOSCONI, M.C et FERRARI, A.
Swimmer's itch in lake Garda.
Igiene Moderna (1998); 110: 443-457.

GOTTSCHALK, C; et PRANGE, H.
Parasiten des Grauen Kranichs *Grus grus* (L.) in Europa.
Berl. Munch. Tierarztl Wochenschr. 2002: 115(5-6): 203-6.

GRABE, K. et HAAS, W.
Navigation within host tissues: cercariae orientate towards dark after penetration.
Parasitol. Res. 2004; 93 (2): 111-3.

GUINDON, S., LETHIEC, F., DUROUX, P. et GASCUEL, O.
PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference.
Nucleic Acids Res. 2005; 33 (Web Server issue): W557-9.

HAAS, W. et PIETSCH, U.
Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host.
Parasitol. Res. 1991; 77 (7): 642-4.

HAEMMERLI, U.
Schistosomen-Dermatitis am Zurchsee.
Dermatologica 1953; 107 (5): 302-41.

HARDING, J. R.
Cardiff's tropical disease: cercarial dermatitis.
Med. Hist. 1978; 22 (1): 83-8.

HASEGAWA, A. et OTAKI, K.
[The laboratory course for periodontal undergraduate education using a new model developed in our department].
Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi 1985; 27 (1): 213-23.

HEBERT, P. D., RATNASINGHAM, S. et DEWAARD, J. R.
Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.
Proc. Biol. Sci. 2003; 270 Suppl 1: S96-9.

HOEFFLER, D. F.
Cercarial dermatitis.
Arch. Environ. Health 1974; 29 (4): 225-9.

HOEFFLER, D. F.
"Swimmers' itch" (cercarial dermatitis).
Cutis 1977; 19 (4): 461-5, 467.

HORÁK, P. et KOLÁŘOVÁ, L.
Survival of bird Schistosomes in mammalian lungs.
Int. J. Parasitol. 2000; 30 (1): 65-8.

HORÁK, P. et KOLÁŘOVÁ, L.
Bird Schistosomes: do they die in mammalian skin?
Trends Parasitol. 2001; 17 (2): 66-9.

HORÁK, P. et KOLÁŘOVÁ, L.
Molluscan and vertebrate immune responses to bird Schistosomes.
Parasite Immunol. 2005; 27 (7-8): 247-55.

HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L. et ADEMA, C. M.
Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*.
Advances in Parasitology 2002; 52: 155-233.

HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L. et DVOŘÁK, J.
Trichobilharzia regenti n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe.
Parasite 1998; 5 (4): 349-57.

HOSAKA, Y. et BERRY, E. G.
Schistosome miracidial immobilization caused by the tissue extracts preparated from various species or strains of snails.
Japan J. Parasit. 1975; 24: 318-331.

HUELSENBECK, J. P. et RONQUIST, F.
MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees.
Bioinformatics 2001; 17 (8): 754-5.

HWANG, U. W. et KIM, W.
General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics.
Korean J. Parasitol. 1999; 37 (4): 215-28.

ISLAM, K. S.
The morphology and life-cycle of *Trichobilharzia arcuata* n. sp. (Schistosomatidae,: Bilharziellinae) a nasal schistosome of water whistle ducks (*Dendrocygna arcuata*) in Australia.
Systematic Parasitology 1986; 8: 117-128.

ITAGAKI, T., KIKAWA, M., TERASAKI, K., SHIBAHARA, T. et FUKUDA, K.
Molecular characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Korea on the basis of DNA sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial NDI gene.
J Vet Med Sci 2005; 67 (11): 1115-8.

JOE, L. K., BASCH, P. F. et UMATHEVY, T.
Antagonism between two species of larval trematodes on the snail.
Nature 1965; 206 (982): 422-3.

KHALIFA, R.
Studies on Schistosomatidae Looss, 1899 (Trematoda) of aquatic bird of Poland. I. On the cycle of *Bilharziella polonica* Kowalesski, 1895, with a discussion of the subfamily Bilharziellinae Price, 1929.
Acta Parasitologica Polonica, 1972, *20*, 343-365.

KHALIFA, R.
Studies on Schistosomatidae Looss, 1899 (Trematoda) of aquatic bird of Poland. III. Notes on the morphology and life cycle of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Braun, 1901).
Acta Parasitologica Polonica, 1976, *24*, 1-9.

KAHLIL, L.F.
Family Schistosomatidae Stiles and Hassal, 1898.
A. Gibson, A . Jones and R.A. Bray, Keys to the trematoda, 2002, Vol. I. Cab publishing, London , 419-432.

KHALIL, M., ISLAM, Z. et ISLAM, R.
Effects of age in the structure of the bursa of Fabricius of deshi chicken of Bangladesh.
Mymensingh Med. J. 2002; 11 (2): 91-3.

KNIGHT, R. et WORMS, M. J.
An outbreak of cercarial dermatitis in Britain.
Trans. R .Soc. Trop. Med. Hyg. 1972; 66 (1): 21.

KOCK, S.
Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae).
Parasitology 2001; 123 (Pt 1): 67-70.

KOLÁŘOVÁ, L., GOTTWALDOVA, V., CECHOVA, D. et SEVCOVA, M.
The occurrence of cercarial dermatitis in Central Bohemia.
Zentralbl Hyg. Umweltmed 1989; 189 (1): 1-13.

KOLÁŘOVÁ, L., HORÁK, P. et FAJFRLIK, K.
Cercariae of *Trichobilharzia szidati* Neuhaus, 1952 (Trematoda: Schistosomatidae): the causative agent of cercarial dermatitis in Bohemia and Moravia.
Folia Parasitol. 1992; 39 (4): 399-400.

KOLÁŘOVÁ, L., HORÁK, P. et SITKO, J.
Cercarial dermatitis in focus: Schistosomes in the Czech Republic.
Helminthologia 1997; 34 (3): 127-139.

KOLÁŘOVÁ, L., RUDOLFOVÁ, J., HAMPL, V. et SKÍRNISSON, K.
Allobilharzia visceralis gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae-Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.) (Anatidae).
Parasitol. Int. 2006; 55 (3): 179-86.

KOLÁŘOVÁ, L., SKÍRNISSON, K. et HORÁK, P.
Schistosome cercariae as the causative agent of swimmer's itch in Iceland.
J. Helminthol. 1999; 73 (3): 215-20.

KOLÁŘOVÁ, L., SYKORA, J. et BAH, B. A.
Serodiagnosis of cercarial dermatitis with antigens of *Trichobilharzia szidati* and *Schistosoma mansoni*.
Cent. Eur. J. Public Health 1994; 2 (1): 19-22.

KOUŘILOVÁ, P., HOGG, K. G., KOLÁŘOVÁ, L. et MOUNTFORD, A. P.
Cercarial dermatitis caused by bird Schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions.
J. Immunol. 2004a; 172 (6): 3766-74.

KOUŘILOVÁ, P., SYRUCEK, M. et KOLÁŘOVÁ, L.
The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status.
Parasitol. Res. 2004b; 93 (1): 8-16.

KOWALEWSKI, L.
Bilharziella polonica sp. nov. (Studya helmintologiczne 3).
Rozprawy Wydzialu Matematyczno-Przyrodniczego Polskiej Akademii. Umiejetnosci Krakow, 1895, *31*, 41-70

KUMAR, S., TAMURA, K. et NEI, M.
MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment.
Brief. Bioinform. 2004; 5 (2): 150-63.

LAL, M.B.
Studies on the Trematodes parasites of the birds. Part II. Morphology and Systematic position of some new Blood-Flukes of the family Schistosomidae.
Proceedings of the Indian Academy of Sciences, 1937, *6*, 274-283.

LE, T. H., BLAIR, D., AGATSUMA, T., HUMAIR, P. F., CAMPBELL, N. J., IWAGAMI, M., LITTLEWOOD, D. T., PEACOCK, B., JOHNSTON, D. A., BARTLEY, J., ROLLINSON, D., HERNIOU, E. A., ZARLENGA, D. S. et MCMANUS, D. P.
Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders-a cautionary tale from the parasitic flatworms.
Mol. Biol. Evol. 2000; 17 (7): 1123-5.

LE, T. H., HUMAIR, P. F., BLAIR, D., AGATSUMA, T., LITTLEWOOD, D. T. et MCMANUS, D. P.
Mitochondrial gene content, arrangement and composition compared in African and Asian Schistosomes.
Mol. Biochem. Parasitol. 2001; 117 (1): 61-71.

LEENEN, E. J. T. L. M. et DE RODA HUSMAN, A. M.
Gezondheidsklachten in verbaud met recreative in oppervlaktewater in de zomers van 2000, 2001 en 2002.(Health complaints concerning water recreation in the netherlands in 2000, 2001 and 2002).
Infectieziekten Bulletin 2004; 15: 178-183.

LÉGER, N. et MARTIN-LOEHR, C.
La dermatite cercarienne: un désagrément des baignades estivales.
Actual. Pharm. 1999; (377): 49-50.

LEITE, A.C.R., COSTA, H.M.A., COSTA, J.O., GUIMARAES, M.P. et LIMA, W.S.
The life cycle of *Dendritobilharzia anatinarum* Cheatum, 1941 (Trematoda, Schistosomatidae).
Memorias do Instituot Oswaldo Cruz, 1982, *77*, 389-396.

LEVINE, N. D., CLARK, D. T. et HANON, L. E.
Encephalitis in a swan due to *Dendritobilharzia* sp. (Trematoda; Schistosomatidae).
J. Parasitol. 1956; 42: 496-500.

LICHTENBERGOVÁ, L., KOLBEKOVÁ, P., KOUŘILOVÁ, P., KAŠNÝ, M., MIKEŠ, L., HAAS, H., SCHRAMM, G., HORÁK, P., KOLÁŘOVÁ, L. et MOUNTFORD, A.P.
Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis.
Parasite Immunology (2008); 30: 585-595.

LIE, K. J.
Studies on *Echinostoma* (Trematoda) in Malaya. XII. Antagonism between two species of Echinostome trematodes in the same lymnaied snail.
J. Parasitol. 1966; 52 (3): 454-457.

LIE, K. J. et HEYNEMAN, D.
Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails.
Int.J. Parasitol. 1975; 5 (6): 621-5.

LIE, K. J. et HEYNEMAN, D.
Studies on resistance in snails. 3. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata*.
J. Parasitol. 1976a; 62 (1): 51-8.

LIE, K. J. et HEYNEMAN, D.
Studies on resistance in snails. 5. Tissue reactions to *Echinostoma lincloense* in naturally resistant *Biomphalaria glabrata*.
J. Parasitol. 1976b; 62 (2): 292-7.

LIE, K. J., HEYNEMAN, D. et KOSTANIAN, N.
Failure of *Echinostoma lindoense* to reinfect snails already harboring that species.
Int. J.Parasitol. 1975a; 5 (5): 483-6.

LIE, K. J., HEYNEMAN, D. et LIM, H. K.
Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails.
Int. J. Parasitol. 1975b; 5 (6): 627-31.

LIE, K. J. et HEYNMAN, D.
Studies on resistance in snails. 6. Escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snail heart and subsequent loss of the host's ability to resist infection by the same parasite.
J. Parasitol. 1976; 62 (2): 298-302.

LITTLEWOOD, D., T., J. et BRAY, R., A.
Interrelationships of the Platyhelminthes.
Taylor and Francis: The Systematics Association Special Volume Series 60; 2001

LITTLEWOOD, D. T. et JOHNSTON, D. A.
Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences.
Parasitology 1995; 111 (Pt 2): 167-75.

LITTLEWOOD, D. T., LOCKYER, A. E., WEBSTER, B. L., JOHNSTON, D. A. et LE, T. H.
The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms.
Mol.Phylogenet. Evol. 2006; 39 (2): 452-67.

LIU, Z. et BAI, G.
On bird schistosomes from Jilin Province: *Jilinobilharzia crecci* gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae: Bilharziellinae) with a discussion on the taxonomy of the subfamily of Bilharziinae.
Acta Zoologica Sinica, 1976, *22*, 385-392.

LLEWELLYN, B.
Host-specificity in monogenetic Trematodes.
P. Attinger S. A.; Neuchâtel: 1957.

LOCKYER, A. E., OLSON, P. D., OSTERGAARD, P., ROLLINSON, D., JOHNSTON, D. A., ATTWOOD, S. W., SOUTHGATE, V. R., HORÁK, P., SNYDER, S. D., LE, T. H., AGATSUMA, T., MCMANUS, D. P., CARMICHAEL, A. C., NAEM, S. et LITTLEWOOD, D. T.
The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858.
Parasitology 2003; 126 (Pt 3): 203-24.

LOKER, E. S. et BRANT, S. V.
Diversification, dioecy and dimorphism in Schistosomes.
Trends Parasitol. 2006; 22 (11): 521-8.

LOY, C. et HAAS, W.
Prevalence of cercariae from *Lymnaea stagnalis* snails in a pond system in Southern Germany.
Parasitol. Res. 2001; 87 (10): 878-82.

MACKO, J. K.
Zur Revision der Systematik der Trematode *Dendritobilharzia anatinarum* Cheatum, 1941.
Helminthologia 1959; 1: 133-137.

MARTORELLI, S. R.
Dendritobilharzia rionegrensis sp. nov. (Digenea Schistosomatidae).
Neotropica 1981; 27: 171-177.

MCMANUS, D. P. et BOWLES, J.
Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics.
Int. J. Parasitol. 1996; 26 (7): 687-704.

MCMULLEN, D., B., et BEAVER, P., C.
Studies on schistosome dermatitis. IX. The life cylces of three dermatitis-producing Schistosomes from birds and a discussion of the subfamily Bilharziellinae. (Trematoda: Schistosomatidae).
Amer. J. Hyg. 1945; 42: 128-154.

MEHRA, H. R.
A new distome *Enterohaematotrema* n.g. and new blood fluke *Hemiorchis bengalensis* n.sp. belonging to the family Spirorchiidae Stunkard, and a new species of the genus *Dendritobilharzia* Skrjabin and Zakharow belonging to the family Schistosomatidae Poche, with remarks on the evolution of the blood flukes.
Proc. Nat. Acad. Sc. India 1940; 10: 100-118.

MEULEMAN, E. A., HUYER, A. R. et MOOIJ, J. H.
Maintenance of the life cycle of *Trichobilharzia ocellata* via the duck *Anas platyrhynchos* and the pond snail *Lymnea stagnalis*.
Netherlands Journal of Zoology 1984; 34 (3): 414-417.

MOINET-FELDER, S.
La dermatite des nageurs. Etude d'une stratégie prophylactique dans le cadre du foyer du lac d'Annecy.
Th. D. : Pharm. : Reims : 2002

MOLLARET, I., JAMIESON, B. G., ADLARD, R. D., HUGALL, A., LECOINTRE, G., CHOMBARD, C. et JUSTINE, J. L.
Phylogenetic analysis of the Monogenea and their relationships with Digenea and Eucestoda inferred from 28S rDNA sequences.
Mol. Biochem. Parasitol. 1997; 90 (2): 433-8.

MÜLLER, V. et KIMMIG, P.
Trichobilharzia franki n. sp. - Die Ursache für Badedermatitiden in südwestdeutschen Baggerseen.
Applied Parasitology 1994; 34: 187-201.

NAEGELI, O.
Uber einen beim Baden entsehenden Hautausschlag, die sog. Hundsblattern. (*Exanthema caniculare*).
Schweiz Med Wochenschr 1923; 49: 1221-22.

NEUHAUS, W.
Biologie und Entwicklung von *Trichobilharzia szidati* n. sp. (Trematoda, Schistosomatidae). Einem Erreger von Dermatitis beim Menschen.
Z. Parasitenkd. 1952; 15 (3): 203-66.

NIEWIADOMSKA, K., VALTONEN, E.T. et SIDDALL, R.
Cercariae from *L. stagnalis* in lake Kuuhankawesi (Central Finland).
Acta Parasitol. (1997); 42: 132-137.

OLIVIER, L.
Schistosome dermatitis, a sensitization phenomenon.
Am. J. Hyg. 1949; 49 (3): 290-302.

OLIVIER, L.
Observations on the migration of avian Schistosomes in mammals previously unexposed to cercariae.
J. Parasitol. 1953; 39 (3): 237-46.

OLSON, P. D., CRIBB, T. H., TKACH, V. V., BRAY, R. A. et LITTLEWOOD, D. T.
Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda).
Int. J. Parasitol. 2003; 33 (7): 733-55.

PALM, V.
Ein Beitrag zur Helminthenfauna des Blesshuhns (*Fulica atra* L.) aus dem Raum von Postdam.
Acta Parasitologica Polonica, 1965, *13*, 425-444.

PALMER, D. et OSSENT, P.
Nasal schistosomiasis in Mute Swans in Switzerland.
Revue suisse Zool. 1984; 91: 709-715.

PFENNINGER, M., CORDELLIER, M. et STREIT, B.
Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata).
BMC Evol Biol 2006; 6: 100.

PFENNINGER, M., STAUBACH, S., ALBRECHT, C., STREIT, B. et SCHWENK, K.
Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O.F. Muller, 1774).
Mol. Ecol. 2003; 12 (10): 2731-45.

PHILIPPE, H.
MUST a computer package of management utilities for sequences and trees.
Nucleic Acids Resesarch, 1993, *21*, 5264-5272

PICARD, D. et JOUSSON, O.
Genetic variability among cercariae of the Schistosomatidae (Trematoda: Digenea) causing swimmer's itch in Europe.
Parasite 2001; 8 (3): 237-42.

PICHER, O., ASPOCK, H. et WIEDERMANN, G.
Die Zerkarien-Dermatitis--eine Parasitose einheimischer Badegewasser.
MMW Munch Med Wochenschr 1974; 116 (32-33): 1452.

POSADA, D. et CRANDALL, K. A.
Selecting the best-fit model of nucleotide substitution.
Syst. Biol. 2001; 50 (4): 580-601.

RIND, S.
Dendritobilharzia pulverulenta (Trematoda: Schistosomatidae) in New Zealand.
New Zealand Journal. of Zoology, 1989, *16*, 215-220.

RUDOLFOVÁ, J., HAMPL, V., BAYSSADE-DUFOUR, C., LOCKYER, A. E., LITTLEWOOD, D. T. et HORÁK, P.
Validity reassessment of *Trichobilharzia species* using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host.
Parasitol. Res. 2005; 95 (2): 79-89.

RUDOLFOVÁ, J., LITTLEWOOD, D. T., SITKO, J. et HORÁK, P.
Bird Schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland.
Folia Parasitol. (Praha) 2007; 54 (2): 88-93.

RUDOLFOVÁ, J., SITKO, J. et HORÁK, P.
Nasal Schistosomes of wildfowl in the Czech Republic.
Parasitol. Res. 2002; 88 (12): 1093-5.

RUDOLFOVÁ, J., SITKO, J. et HORÁK, P.
Unusual finding of *Trichobilharzia* sp. in *Motacilla alba* in the Czech Republic.
J. Helminthol. 2006; 80 (1): 83-5.

SCHALLIG, H. D., SASSEN, M. J., HORDIJK, P. L. et DE JONG-BRINK, M.
Trichobilharzia ocellata: influence of infection on the fecundity of its intermediate snail host Lymnaea stagnalis and cercarial induction of the release of schistosomin, a snail neuropeptide antagonizing female gonadotropic hormones.
Parasitology 1991; 102 Pt 1: 85-91.

SCHETS, F. M., LODDER, W. J., VAN DUYNHOVEN, Y. T. et DE RODA HUSMAN, A. M.
Cercarial dermatitis in the Netherlands caused by *Trichobilharzia* spp.
J. Water Health 2008; 6 (2): 187-95.

SIMON MARTIN, F. et SIMON VICENTE, F.
The life cycle of *Trichobilharzia salmanticensis* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae), related to cases of human dermatitis.
Research and Reviews in Parasitology 1999; 59: 1-2.

SEPULVEDA, M.S., SPALDING, M.G., KINSELLA, J.M., BJORK, R.D. et MAC LAUGHLIN, G.S.
Helminths of the roseate spoonbill *Ajaiai ajaja*, in Southern Florida.
Journal of Helminthological Society of Washington, 1994, 61, 179-189.

SKÍRNISSON, K. et KOLÁŘOVÁ, L.
[Are nasal *Trichobilharzia* cercariae potential threath to human health?].
Laeknabladid 2002; 88 (10): 739-744.

SKÍRNISSON, K. et KOLÁŘOVÁ, L.
Diversity of bird Schistosomes in anseriform birds in Iceland based on egg measurements and egg morphology.
Parasitol Res 2008; 103 (1): 43-50

SLUITERS, J. F.
Zwemmersjeuk eu de mogelijkheid tot preventie. (Swimmer itch and a road to prevention).
Infectieziekten Bulletin 2004; 15: 184-189.

SMINIA, T., VAN DER KNAAP, W. P. et EDELENBOSCH, P.
The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*.
Dev. Comp. Immunol. 1979; 3 (1): 37-44.

SNYDER, S. D.
Phylogeny and paraphyly among tetrapod blood flukes (Digenea: Schistosomatidae and Spirorchiidae).
Int. J. Parasitol. 2004; 34 (12): 1385-92.

SNYDER, S. D. et LOKER, E. S.
Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (Platyhelminthes:Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma*.
J. Parasitol. 2000; 86 (2): 283-8.

SOUSA, W., P.
Spacial scale and the processes structuring a guild of larval trematode parasites.
Parasites communities, patterns and processes. 1990; Chapman and Hall: 41-67.

STUMPF, J. L. et GILBERTSON, D. E.
Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: factors affecting variability.
J Invertebr Pathol 1978; 32 (2): 177-81.

STUNKARD, H.W.
Induced gametogenesis in a Monogenetic Trematode, *Polystoma stellai* Vigueras, 1955.
Journal of Parasitology, 1959, *45*, 389-394.

SULGOSTOWSKA, T.
Extra-intestinal trematodes in birds of the mesotrophic lakes: Goldapiwo and Mamry Polnocne.
Acta Parasitologica Polonica 1960; 8: 471-492.

SWOFFORD, D.L.
PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and others methods). Version 4.
Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets: 2002

SZIDAT, L.
Die Parasiten des Hausgeflügels. 3 *Bilharziella polonica* Kow. ein im Blut Schmarotzender Trematode unserer Enten, seine Entwicklung und Ubertragung.
Archiv für Geflügelkude, 1929, *3*, 78-87.

SZIDAT, L.
Uber Hautinfektionen bei Bluttrematoden insbesondere bei *Bilharziella polonica* Kow.
Archiv für Dermatologie und Syphilis, 1930, 160, 304-308.

SZIDAT, L.
Pseudobilharziella filiformis n.sp. eine neue Vogelbilharzie aus dem Höckerschwan, *Cygnus olor* L.
Z. Parasitenkunde 1938; 10: 36-45.

THUNE, P.
Cercariadermatitt eller svommekloe--et lite kjent, men hyppig forekommende sykdomsbilde i Norge.
Tidsskr Nor Laegeforen 1994; 114 (15): 1694-5.

ULMER, M. J. et VAN DE VUSSE, F. J.
Morphology of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Braun, 1901) Skrjabin, 1924 (Trematoda: Schistosomatidae) with notes on secondary hermaphrodism in males.
J. Parasitol. 1970; 56: 67-74.

VAN BOLHUIS, G. H., RIJKS, J. M., DORRESTEIN, G. M., RUDOLFOVÁ, J., VAN DIJK, M. et KUIKEN, T.
Obliterative endophlebitis in mute swans (*Cygnus olor*) caused by *Trichobilharzia* sp. (Digenea: Schistosomatidae) infection.
Vet. Pathol. 2004; 41 (6): 658-65.

VAN DE VUSSE, F.J.
Host-Parasite relations of *Dendritobilharzia pulverulenta* (Trematoda: Schistosomatidae) and anatids.
Journal of Parasitology, 1979, *65*, 894-897.

VAN DE VUSSE, F. J.
A review of the genus *Dendritobilharzia* Skrjabin and Zakharow 1920 (Trematoda: Schistosomatidae).
J. Parasitol. 1980; 66: 814-822.

VERBRUGGE, L. M., RAINEY, J. J., REIMINK, R. L. et BLANKESPOOR, H. D.
Swimmer's itch: incidence and risk factors.
Am. J.Public Health 2004; 94 (5): 738-41.

WEBSTER, B. L., RUDOLFOVÁ, J., HORÁK, P. et LITTLEWOOD, D. T.
The complete mitochondrial genome of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* (Platyhelminthes: Digenea), causative agent of cercarial dermatitis.
J. Parasitol. 2007; 93 (3): 553-61.

WILSON, R.B., NEW, J.C. et SCHOLTENS, R.G.
Granulomatous encephalitis caused by schistosomiasis in swans.
Jounal of America. Veterinar. Medical Association, 1982, *181*, 1386-1387.

WOJCINSKI, Z.W., BARKER, I.K., HUNTER, D.B. et LUMSDEN, H.
An outbreak of schistosomiasis in Atlantic brant geese, *Branta bernicola hrota.*
Journal of Wildlife Diseases, 1987, *23*, 248-255.

WRIGHT, C., A.
Relationships between Trematodes and Molluscs.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 1960; 54(1): 1-7.

YAMAGUTI S.
Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates.
Tokyo : Keigaku publishing Co, 1971

ZBIKOWSKA, E.
Is there a potential danger of "swimmer's itch" in Poland?
Parasitology Research, 2003, *89*, 59-62

ZBIKOWSKA, E.
Infection of snails with bird schistosomes and the threat of swimmer's itch in selected Polish lakes.
Parasitology Research, 2004, *92*, 30-35

ZURITA, M., BIEBER, D., RINGOLD, G. et MANSOUR, T. E.
cDNA cloning and gene characterization of the mitochondrial large subunit (LSU) rRNA from the liver fluke *Fasciola hepatica*. Evidence of heterogeneity in the fluke mitochondrial genome.
Nucleic Acids Res. 1988; 16 (14B): 7001-12.