

Arguments en faveur d'une modification du génome (introgression) du parasite humain *Schistosoma haematobium* par des gènes de *S. bovis*, au Niger

PHILIPPE BRÉMOND, BERTRAND SELLIN, ÉLISABETH SELLIN, BABADI NAMÉOUA, RABIOU LABBO, ANDRÉ THÉRON, CLAUDE COMBES

Evidence for the introgression of the human parasite *Schistosoma haematobium* by genes from *S. bovis*, in Niger

ABSTRACT

Characterization of schistosome populations from human in eastern Niger, through intra-uterine egg morphology of female parasites and phenotypic analyses of worms observed for acid phosphatase using electrophoretic separation, renders results that suggest an introgression of *S. haematobium* from man by genes of *S. bovis*, a parasite of domestic livestock. The origin of this introgression, that could implicate *S. curassoni* as well, another livestock parasite that hybridize with *S. bovis*, is discussed. ▲

Mots clés : parasite, schistosome, populations, interactions génétiques, introgression, œufs, isoenzymes.
Key words : parasite, schistosome, populations, genetic interactions, introgression, eggs, isoenzymes.

ABRIDGED VERSION

Researches on the biology of schistosome populations (blood helminths parasitizing mammals and responsible for bilharziasis in humans) demonstrate that genetic interactions can occur between different species of the same group. The infection of man by schistosomes from wild or domestic animals could involve, through a natural hybridization with human schistosomes, the appearance of new characters modifying transmission patterns and/or parasitic pathogenicity.

Three species of schistosomes of the same group exist sympatrically in the mid-eastern region of Niger. One of these species, *Schistosoma haematobium*, infects humans, while the two others, *S. bovis* and *S. curassoni*, parasitize ungulates. The existence of water supplies which provide a suitable habitat for many species of bulins, in particular *Bulinus umbilicatus*, which is capable of intervening locally in the transmission of the 3 species of schistosomes, offers a favorable epidemiological situation to the establishment of interspecific genetic interactions.

Note présentée par André Capron.

Note remise le 3 mai 1993, acceptée après révision le 21 juin 1993.

MICROBIOLOGIE

Microbiology

Ph. B., B. S., E. S., B. N., R. L. :
Laboratoire des Schistosomiases,
CERMES (ORSTOM/O.C.C.G.E.),
BP 10887, Niamey, Niger.
A. T., C. C. : Laboratoire de Biologie
Animale, CNRS, URA 698, Centre
de Biologie et d'Écologie tropicale
et méditerranéenne, Université,
52, av. de Villeneuve,
66860 Perpignan Cedex, France.
Reprints : A. Théron

RÉSUMÉ

La caractérisation de schistosomes par la morphologie des œufs intra-utérins des vers femelles et l'analyse des phénotypes des parasites observés pour la phosphatase acide après séparation électrophorétique suggère la présence de gènes de *S. bovis*, parasite du bétail domestique, chez des schistosomes issus de l'homme dans la région est du Niger et présumés appartenir à l'espèce *S. haematobium*. Cette introgression naturelle pourrait également impliquer *S. curassoni*, un autre schistosome du bétail sympatrique des 2 autres espèces dans cette région. ▲

We have studied the specific status of the schistosomes from this region, comparing the human parasites (*S. haematobium* from children of the village of Raffa) to the standards of the 3 species originating from other areas of the country and to their corresponding experimental hybrids. The results presented here were obtained through a characterization of the parasites by means of morphological markers (shape of intra-uterine eggs) and biochemical markers (polymorphism of the acid phosphatase, AcP : E.C. 3.1.3.2, by isoelectric focusing (IEF) on polyacrylamide gel).

Results have led us to discover in the natural population of human schistosomes (Raffa's population) the presence, in *S. haematobium*, of genes belonging to *S. bovis*, a sympatric species of livestock schistosome. This phenomena is substantiated by two concurring arguments : 1) the detection, in a supposed *S. haematobium* female worm of the first laboratory generation, of eggs morphologically comparable to those obtained after experimental hybridization between *S. haematobium* and *S. bovis* or between *S. bovis* and *S. curassoni* ; 2) the confirmation of this result, by IEF analysis of cercariae from 2nd generation having AB phenotype for AcP, characteristics of hybrids between *S. haematobium* and *S. bovis* or

ORSTOM Fonds Documentaire

29 OCT. 1993

N° 5 38.299 ex 1

Cont. P. B.

between *S. bovis* and *S. curassoni* as well. Being that *S. bovis* is the only species to possess the allele AcP^a (A), (*S. haematobium* and *S. curassoni* are characterized by homozygous BB phenotype for AcP), observation of AB phenotype within the cercariae indicates that there was hybridization over and above the 2nd generation and that the phenomena observed could be an introgression of *S. haematobium* by *S. bovis* genes. As far as we know, this is the first time that an introgression of *S. haematobium* by genes of schistosomes specific to ungulates, such as *S. bovis*, is suggested. The exact origin of this introgression remains to be uncovered. Two hypotheses are possible and we consider the second as being more probable. 1) The atypical female observed in the first generation would be produced from an hybridization between *S. haematobium* and *S. bovis* that would

Les recherches sur la biologie des populations de schistosomes (trématodes parasites du système sanguin de vertébrés et responsables des bilharzioses) révèlent de plus en plus l'existence d'interactions géniques entre espèces d'un même groupe. En Afrique, des hybridations détectées entre schistosomes à œuf à éperon terminal concernent le plus souvent des espèces parasitant le même type d'hôte : *S. haematobium* et *S. intercalatum* chez l'homme [1, 2], *S. bovis* et *S. curassoni* chez les ruminants [3-5]. Le seul cas d'hybridation entre schistosomes de l'homme et des animaux domestiques fait intervenir d'une part *S. haematobium*, d'autre part *S. mattheei*, qui parasite les ruminants mais aussi l'homme [6-8]. En revanche, une interaction entre schistosomes spécifiques de l'homme et spécifiques des ongulés, pouvant entraîner par le biais d'une hybridation naturelle l'apparition de caractères nouveaux modifiant les conditions de transmission et/ou la pathogénicité du parasite, n'est pas prouvée : le cas de *S. curassoni*, suspecté au Sénégal d'interagir chez l'homme avec *S. haematobium* [9, 10], est sujet à controverse [11, 12] et reste à élucider.

Dans la région centre-est du Niger, 3 espèces de schistosomes sont en situation sympatrique : *S. haematobium*, *S. bovis* et *S. curassoni* [13]. L'existence dans cette région de collections d'eau hébergeant diverses espèces de bulins susceptibles d'intervenir localement dans la transmission des 3 espèces offre une situation épidémiologique particulièrement favorable à l'établissement de relations interspécifiques. Nous nous sommes intéressés au statut

have rendered through a back-cross with *S. haematobium* individuals exhibiting an AB phenotype for AcP. 2) The other one hypothesis is that humans can be susceptible to an infection by hybrid schistosomes resulting from interbreeding between *S. bovis* and *S. curassoni*. These hybrids, through an enlargement of their host spectrum, could infest humans, mate with *S. haematobium* and produce offsprings with genes from the three species. This last hypothesis relies heavily on the epidemiological situation in the area of Raffa. The village is situated in a region where *S. bovis* and *S. curassoni* are not only sympatrical, but also hybridize naturally. The confirmation of this hypothesis relies on the development of others markers allowing the differentiation between *S. haematobium* and *S. curassoni*. ▲

spécifique des schistosomes hébergés par l'homme dans cette région (population de Raffa), en les comparant à des standards représentatifs des 3 espèces et aux hybrides expérimentaux leur correspondant. Les résultats présentés ont été obtenus à partir d'une caractérisation des parasites par des marqueurs morphologique (forme des œufs intra-utérins) et biochimique (phénotypes de la phosphatase acide).

Matériel et méthodes

Souches de référence des schistosomes

Nous avons utilisé 18 souches originaires de différentes régions du Niger (Fig. 1) : 11 de *S. haematobium*, extraites à partir d'œufs prélevés dans les urines d'enfants parasités et maintenues sur rongeurs pendant 2 générations, 3 de *S. curassoni* (Zinder) et 4 de *S. bovis*, extraites à partir d'organes d'animaux parasités ou de mollusques naturellement infestés, et maintenues sur rongeurs, ovins et caprins pendant 1 à 5 générations. Le statut spécifique des schistosomes a été vérifié par 3 critères d'identification : morphologie des œufs [5, 14], chronobiologie de l'émission cercarienne [15, 16] et spécificité vis-à-vis des hôtes définitifs [17].

Réalisation des hybrides expérimentaux

Les hybrides F1 ont été obtenus par croisements effectués chez les rongeurs entre clones des 3 espèces prises 2 à 2.

Origine des schistosomes anthropophiles de Raffa

Cette souche a été extraite en 1992 à partir d'œufs issus des urines de 60 enfants du village de Raffa, où la prévalence

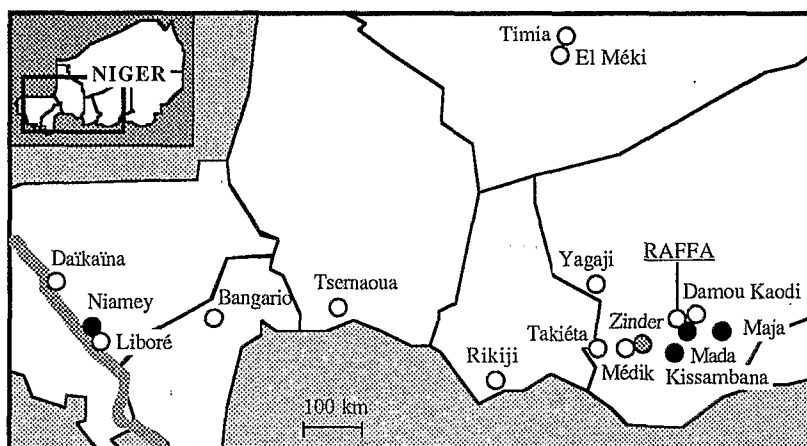


Figure 1. *Origine géographique des Schistosoma haematobium* (cercles blancs), *S. bovis* (en noir) et *S. curassoni* (en gris) utilisés pour cette étude.

de la schistosomiase urinaire est de 92 % (46/50) chez les enfants scolarisés (âge : 10 à 13 ans).

Analyse électrophorétique

Elle a porté sur le polymorphisme de la phosphatase acide (AcP : E.C. 3.1.3.2) analysé en gradient de pH 3-10 par isoélectrofocalisation (IEF) en gel mince de polyacrylamide [18] à partir d'extraits correspondant soit à des vers adultes, dans le cas des types de référence et de la 1^{re} génération issue de la population de Raffa, soit à des cercaires concentrées par aspiration sur une membrane nucléopore disposée dans un porte-filtre Swinnex[®], dans le cas de la 2^e génération originaire de Raffa.

Résultats

Caractérisation des types de référence

Les effectifs des vers mâles et femelles des types de référence analysés en IEF pour AcP et les phénotypes leur correspondant sont indiqués sur la Figure 2. L'analyse du polymorphisme d'AcP, dont la structure dimérique est attestée par l'existence d'hétérozygotes à 3 bandes, met en évidence un seul locus possédant 3 allèles : AcPa (A) et AcPa' (A'), caractéristiques de *S. bovis* (phénotypes AA, A'A et A'A'), et AcPb (B), commun à *S. haematobium* et *S. curassoni* (phénotype BB). Les hybrides *S. haematobium*/*S. curassoni* montrent un phénotype BB identique à celui des parents, tandis que ceux entre *S. bovis* et l'une ou l'autre de ces 2 espèces montrent un phénotype AB ou A'B, distinct de ceux des parents.

L'observation microscopique des œufs intra-utérins des vers femelles livre des résultats concordants : *S. haematobium*, *S. curassoni* et leurs hybrides présentent des œufs morphologiquement proches, très différents de ceux observés pour *S. bovis* ; les hybrides entre cette dernière espèce et *S. haematobium* ou *S. curassoni* possèdent un œuf présentant une morphologie intermédiaire entre celles observées pour les parents.

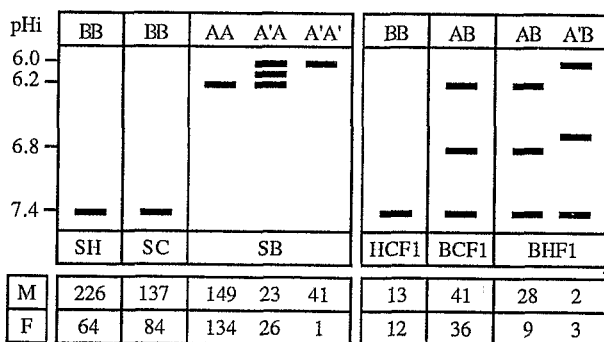


Figure 2. **Phénotypes observés pour la phosphatase acide (AcP) après séparation en IEF des allozymes des schistosomes mâles (M) et femelles (F) des types de référence : Schistosoma haematobium (SH), S. curassoni (SC), S. bovis (SB) ; hybrides F1 entre S. haematobium et S. curassoni (HC F1), S. bovis et S. curassoni (BC F1), S. bovis et S. haematobium (BH F1).**

Caractérisation des schistosomes anthropophiles de Raffa

La 1^{re} génération, obtenue à partir de 154 mollusques positifs, a livré 117 vers (32 mâles et 31 femelles chez

1 hamster ; 41 mâles et 13 femelles chez 4 souris). L'examen microscopique des œufs intra-utérins révèle pour 43 femelles des œufs de type *S. haematobium* (ou *S. curassoni*) et pour 1 femelle issue du hamster des œufs du type de ceux des hybrides entre *S. bovis* et *S. haematobium* ou *S. curassoni*. Les 21 mâles analysés pour AcP, dont 14 issus du hamster, présentent un phénotype BB de type *S. haematobium* (ou *S. curassoni*).

Sur les 26 bulins positifs obtenus en 2^e génération, 14 ont permis la préparation d'extraits cercariens qui ont montré pour AcP : 12 phénotypes BB caractéristiques de *S. haematobium* ou *S. curassoni*, 1 AB caractéristique des hybrides entre ces espèces et *S. bovis* et 1 proche du type AB, mais dont la bande à pH 7,4, plus marquée, traduit vraisemblablement une double infestation par des miracidiums de génotypes AB et BB.

Conclusion

L'ensemble de nos résultats suggèrent la présence de gènes d'une espèce de schistosome spécifique d'ongulés, *S. bovis*, au sein d'une population naturelle hébergée par l'homme à Raffa. Ce phénomène est attesté par 2 arguments concordants : 1) la détection en 1^{re} génération de laboratoire, chez une femelle supposée appartenir à l'espèce *S. haematobium*, d'œufs caractéristiques des hybrides entre *S. bovis* et *S. haematobium* ou *S. curassoni* ; 2) la détection en 2^e génération, chez 2 des 14 pools de cercaires analysés en IEF pour AcP, de phénotypes AB caractéristiques des hybrides entre *S. bovis* (AA, A'A et A'A') et *S. haematobium* ou *S. curassoni* (BB). L'existence des phénotypes AB montre qu'il y a eu hybridation en amont de la 2^e génération ; leur origine doit selon nous être attribuée à une transmission des gènes de la femelle atypique du 1^{er} passage, dont les œufs de type hybride indiquent que l'échange de gènes initial a eu lieu avant la 1^{re} génération de laboratoire, c'est-à-dire chez l'homme ou encore en amont de celui-ci.

Les 21 schistosomes mâles analysés en 1^{re} génération pour AcP, dont 14 issus du hamster qui hébergeait la femelle atypique, ont livré un phénotype BB caractéristique de *S. haematobium* ou *S. curassoni*, ce qui pose la question d'une infestation de l'homme par *S. curassoni*, suspectée au Sénégal [9] suite au développement, chez un ovin réfractaire à *S. haematobium*, de schistosomes issus d'œufs de type *S. haematobium*/*S. curassoni* récoltés chez l'homme. Cependant, en l'absence de vérification du statut spécifique des vers obtenus, et dans la mesure où des travaux récents n'ont pas permis de confirmer ce résultat [12], nous pensons que les mâles de notre première génération n'appartiennent pas à l'espèce *S. curassoni* et que le phénomène observé serait une introgression de *S. haematobium* par des schistosomes porteurs de gènes de *S. bovis*.

L'origine exacte d'une telle introgression, si elle se confirme, reste à préciser. Nos résultats suggèrent que *S. bovis* n'est pas strictement spécifique des ongulés comme on le pensait, mais pourrait infester l'homme et s'y apparier avec *S. haematobium* pour engendrer une descendance hybride (femelle atypique observée en 1^{re} génération) pouvant donner par *back-cross* avec *S. haematobium* des individus à phénotype AB pour AcP.

Cette hypothèse nous semble discutable pour 2 raisons : 1) si des œufs de *S. bovis* ont été signalés dans des selles humaines, notamment au Niger [19], il n'a à notre connaissance jamais été possible de prouver que l'homme était un hôte viable pour cette espèce ; 2) compte tenu des nombreux sites dans lesquels la transmission simultanée de *S. haematobium* et *S. bovis* est probable au Niger, les cas d'infestation de l'homme par *S. bovis* devraient alors être courants et aisément détectables, ce qui n'est pas le cas. La situation du village de Raffa dans une zone où *S. bovis* et *S. curassoni* sont non seulement sympatriques, mais s'hybrident naturellement chez les ruminants [3, 4], amène à considérer une autre hypothèse, selon laquelle les hybrides entre schistosomes du bétail pourraient, par un élargissement du spectre d'hôtes, infester l'homme, s'y accoupler avec *S. haematobium*, et engendrer ainsi une descendance possédant des gènes issus des 3 espèces, susceptible à son tour d'infester soit l'homme, soit les ruminants.

C'est à notre connaissance la première fois qu'est suggérée la présence de gènes de schistosomes très spécifiques d'ongulés, tels que *S. bovis*, au sein d'une population de schistosomes appartenant vraisemblablement à l'espèce *S. haematobium*, très spécifique de l'homme. Ce phénomène, qui serait lié à une hybridation naturelle impliquant d'une part *S. bovis*, d'autre part *S. haematobium* et/ou *S. curassoni*, révèle une fois encore la complexité des interactions génétiques entre les schistosomes de l'homme et ceux des ongulés. Cependant, qu'il s'agisse du statut spécifique des schistosomes de l'homme à Raffa ou de l'origine de l'hybridation avec *S. bovis*, il apparaît nécessaire de compléter les recherches par l'exploitation de marqueurs autorisant une distinction entre *S. haematobium* et *S. curassoni*, afin d'évaluer quelle importance peut avoir un phénomène d'introgession dans l'évolution des pools de gènes des schistosomes humains et quelles conséquences épidémiologiques ou autres peuvent avoir ces interactions génétiques. ▼

RÉFÉRENCES

1. Wright C. A., Southgate V. R., Van Wijk H. B., Moore P. J. 1974. Hybrids between *Schistosoma haematobium* and *S. intercalatum* in Cameroon. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68: 413-4.
2. Southgate V. R., Van Wijk H. B., Wright C. A. 1976. Schistosomiasis at Loum, Cameroon : *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their natural hybrid. *Z. Parasitenkd.* 49: 145-59.
3. Brémond P., Mouchet F., Chevalier P., Sellin E., Véra C., Sellin B. 1990. Flux génique entre *Schistosoma bovis* et *S. curassoni* au Niger. *Int. Congr. Parasitol.* Paris.
4. Brémond P. 1990. Application des techniques électrophorétiques à deux aspects de la biologie des populations des schistosomes africains : caractérisation des parasites et de leurs hôtes intermédiaires ; détection des schistosomes hybrides. *Actes Conf. O.C.C.G.E. Niamey, Niger*, 182-9.
5. Rollinson D., Southgate V. R., Vercruysse J., Moore P. J. 1990. Observations on natural and experimental interactions between *Schistosoma bovis* and *S. curassoni* from West Africa. *Acta Tropica* 47: 101-14.
6. Pitchford R. J. 1961. Observations on a possible hybrid between the two schistosomes *S. haematobium* and *S. matthei*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 55: 44-51.
7. Wright C. A., Ross G. C. 1980. Hybrids between *S. haematobium* and *S. matthei* and their identification by isoelectric focusing of enzymes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 326-32.
8. Kruger F. J., Schutte C. H. J., Visser P. S., Evans C. 1986. Phenotypic differences in *Schistosoma matthei* ova from populations sympatric and allopatric to *S. haematobium*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 103-7.
9. Gréfillat S. 1962. Une nouvelle zoonose, la « Bilharziose Ouest-Africaine » à *Schistosoma curassoni* Brumpt, 1931, commune à l'homme et aux ruminants domestiques. *C. R. Acad. Sci. Paris* 255: 1805-7.
10. Albaret J. L., Picot H., Diaw O. T., Bayssade-Dufour C., Vassiliades G., Adamson A., Luffau G., Chabaud A. G. 1985. Enquête sur les schistosomoses de l'homme et du bétail au Sénégal, à l'aide des identifications spécifiques fournies par la chétotaxie des cercaires. I. Nouveaux arguments pour la validation de *S. curassoni* Brumpt, 1931, parasite de l'homme et des bovidés domestiques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60: 417-34.
11. Capron A., Deblock S., Biguet J., Clay A., Adenis L., Vernes A. 1965. Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à *S. haematobium*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 32: 755-78.
12. Rollinson D., Vercruysse J., Southgate V. R., Moore P. J., Ross C. G., Walker T. K., Knowles R. J. 1987. Observations on human and animal schistosomiasis in Senegal. In : *Helminth zoonoses*. Geerts S., Kumar V., Brant J., eds. Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 119-31.
13. Mouchet F., Véra C., Brémond P., Théron A. 1989. Preliminary observations on *Schistosoma curassoni* Brumpt, 1931 in Niger. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 811.
14. Touassem R. 1987. Egg polymorphism of *Schistosoma bovis*. *Vet. Parasitol.* 23: 185-91.
15. Pagès J. R., Théron A. 1990. Analysis and comparison of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis* and their hybrid progeny. *Int. J. Parasitol.* 20: 193-7.
16. Mouchet F., Théron A., Brémond P., Sellin E., Sellin B. 1992. Patterns of cercarial emergence of *Schistosoma curassoni* from Niger and comparison with three sympatric species of schistosomes. *J. Parasitol.* 78: 61-3.
17. Vercruysse J., Southgate V. R., Rollinson D. 1984. *Schistosoma curassoni* Brumpt, 1931 in sheep and goats in Senegal. *J. Nat. Hist.* 18: 969-76.
18. Brémond P., Théron A., Rollinson D. 1989. Hybrids between *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini* : characterization by isoelectric focusing of 6 enzymes. *Parasitol. Res.* 76: 138-45.
19. Mouchet F., Develoux M., Magasa M. B. 1988. *Schistosoma bovis* in human stools in Republic of Niger. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 257.