



# Interaction hôte – parasite en contexte insulaire : relations entre *Fasciola hepatica* (Trematoda) et les mollusques *Galba cubensis* et *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda) sur l'île de Cuba

Antonio A. Vazquez Perera

## ► To cite this version:

Antonio A. Vazquez Perera. Interaction hôte – parasite en contexte insulaire : relations entre *Fasciola hepatica* (Trematoda) et les mollusques *Galba cubensis* et *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda) sur l'île de Cuba. Parasitologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT084 . tel-01646808

HAL Id: tel-01646808

<https://theses.hal.science/tel-01646808>

Submitted on 23 Nov 2017

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **SIBAGHE**  
Et de l'unité de recherche **MIVEGEC**

Spécialité : **Microbiologie - Parasitologie**

Présentée par **Antonio A. VÁZQUEZ PERERA**

**Interaction hôte – parasite en contexte  
insulaire : relations entre *Fasciola hepatica*  
(Trematoda) et les mollusques *Galba  
cubensis* et *Pseudosuccinea columella*  
(Gastropoda) sur l'Île de Cuba**

Soutenue le 16 décembre 2015 devant le jury composé de :

**Mme Ghita CHLYEH**

*Professeur, Institut Hassan II, Maroc*

Rapporteur

**Mr Benjamin GOURBAL**

*Maître de Conférences, Université de Perpignan*

Rapporteur

**Mr Philippe JARNE**

*Directeur de Recherche, CEFE, CNRS, Montpellier*

Examinateur

**Mr Nicolas BONEL**

*Chercheur, Universidad Nacional del Sur, Argentine*

Examinateur

**Mme Sylvie HURTREZ-BOUSSÈS**

*Professeur, Université de Montpellier*

Directrice





# Table des Matières

Résumé .....	1
Remerciements .....	4
Avant-propos .....	9
<b>INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
Les interactions hôtes-parasites .....	10
Les maladies transmises par les mollusques d'eau douce : l'exemple de la fasciolose .....	11
Importance de la fasciolose au niveau mondial .....	13
Biologie des douves du foie : le cycle de vie de <i>Fasciola</i> spp. ....	15
Caractéristiques générales des différents stades de développement des douves du foie en particulier <i>Fasciola hepatica</i> .....	17
Diversité d'hôtes définitifs .....	19
Les mollusques hôtes intermédiaires de <i>Fasciola</i> spp. ....	20
Transmission de <i>Fasciola</i> spp. par les limnées à échelle mondiale .....	20
L'Archipel Cubain et la transmission de la fasciolose.....	24
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	<b>27</b>
<b>CHAPITRE 1 : Diversité de la douve du foie (<i>Fasciola hepatica</i>) à Cuba</b>	<b>28</b>
1.1. Relation diversité génétique – capacité d'infection .....	28
1.2. Matériel et Méthodes.....	29
1.2.1. Échantillonnage de <i>Fasciola hepatica</i> et estimations des taux d'infection aux abattoirs.....	29
1.2.2. Extraction d'ADN, amplification de microsatellites et génotypage .....	30
1.2.3. Analyses de génétique de populations .....	31
1.3. Résultats .....	31
1.3.1. Taux d'infection de bovins aux abattoirs.....	31

1.3.2. Structure des populations et diversité génétique .....	32
1.4. Discussion .....	35
1.4.1. Prévalences naturelles de <i>Fasciola hepatica</i> chez les bovins à Cuba.....	35
1.4.2. Infection des vaches versus buffles .....	36
1.4.3. Effets des traitements.....	36
1.4.4. Diversité génétique de <i>Fasciola hepatica</i> à Cuba .....	36
<b>CHAPITRE 2 : Ecologie et biologie des mollusques lymnéidés à Cuba</b>	<b>39</b>
<b>2.1. La famille Lymnaeidae à Cuba : une communauté appauvrie.....</b>	<b>39</b>
2.1.1. <i>Galba cubensis</i> Pfeiffer 1839.....	40
2.1.2. <i>Pseudosuccinea columella</i> Say, 1817.....	41
<b>2.2. Distribution et préférences d'habitats des limnées à Cuba .....</b>	<b>43</b>
2.2.1. Matériel et Méthodes .....	43
2.2.2. Résultats.....	44
2.2.2.1. Distribution de limnées à Cuba.....	44
2.2.2.2. Préférences d'habitats par espèce de limnée à Cuba.....	45
2.2.3. Discussion .....	47
<b>2.3. Ecologie de limnées .....</b>	<b>48</b>
2.3.1. Matériel et Méthodes .....	49
2.3.1.1. Localité de Jibacoa .....	49
2.3.1.2. Localité de La Coca .....	50
2.3.1.3. Echantillonnage et variables mesurées .....	50
2.3.2. Résultats.....	51
2.3.2.1. Localité de Jibacoa .....	51
2.3.2.2 Localités de La Coca.....	53
2.3.3. Discussion .....	57
<b>2.4. Diversité génétique des limnées à Cuba.....</b>	<b>60</b>
2.4.1. Matériel et Méthodes .....	62

2.4.1.1. Populations de limnées utilisées pour les études de génétique de populations.....	62
2.4.1.2. Extraction d'ADN et amplification .....	62
2.4.1.3. Amplification de loci de microsatellites.....	63
2.4.1.3.1. <i>Galba cubensis</i> .....	63
2.4.1.3.2. <i>Pseudosuccinea columella</i> .....	64
2.4.1.4. Génotypage de loci de microsatellites.....	64
2.4.1.5. Analyses de génétique de populations .....	64
2.4.2. Résultats.....	65
2.4.2.1. Dissection de mollusques et infection par des parasites .....	65
2.4.2.2. Diversité génétique chez l'espèce <i>Galba cubensis</i> à Cuba .....	65
2.4.2.3. Diversité génétique chez l'espèce <i>Pseudosuccinea columella</i> à Cuba.....	69
2.4.3. Discussion .....	74
2.4.3.1. Génétique des populations de <i>Galba cubensis</i> et relation avec la transmission de <i>Fasciola hepatica</i> à Cuba .....	74
2.4.3.2. Diversité génétique, pattern de distribution des populations susceptibles et résistantes de <i>Pseudosuccinea columella</i> à Cuba et liens avec les risques de transmission de la fasciolose .....	75
<b>CHAPITRE 3 : Compatibilité dans le système <i>Fasciola hepatica</i>/limnées à Cuba</b>	<b>81</b>
<b>3.1 Infections naturelles des différentes populations de limnées.....</b>	<b>81</b>
3.1.1. Matériels et Méthodes .....	82
3.1.2. Résultats.....	83
3.1.3. Discussion .....	85
3.1.3.1. Appréciation générale de l'infection par les digènes .....	86
3.1.3.2. Prévalences et risques de fasciolose.....	86
3.1.3.3. Variations inter-populations.....	87

3.1.3.4. Variations intra-populations.....	88
<b>3.2 Compatibilités douve-mollusque : infections expérimentales .....</b>	<b>90</b>
3.2.1. Matériels et Méthodes .....	90
3.2.1.1. Echantillonnage des populations de limnées et des souches de parasites .....	90
3.2.1.2. Infections expérimentales.....	91
3.2.1.3. Analyse des données.....	92
3.2.2. Résultats.....	92
3.2.3. Discussion .....	97
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>100</b>
Considérations générales sur la transmission de <i>Fasciola hepatica</i> et le contrôle de la fasciolose : applicabilité des résultats obtenus .....	100
Des risques à surveiller .....	100
Quelles possibilités de contrôles ? .....	102
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>108</b>
<b>ANNEXE – Articles insérés dans la thèse</b>	<b>121</b>



---

## Résumé

**TITRE : Interaction hôte – parasite en contexte insulaire : relations entre *Fasciola hepatica* (Trematoda) et les mollusques *Galba cubensis* et *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda) sur l'Île de Cuba**

---

### RÉSUMÉ

Les interactions hôte – parasites sont des systèmes qui affectent probablement la totalité des êtres vivants et constituent un facteur clé dans la compréhension de la dynamique des maladies infectieuses. Nous avons abordé cette problématique en utilisant le système *Fasciola hepatica*/Lymnaeidae sur l'île de Cuba. Cette thèse utilise une approche basée sur différentes disciplines de la biologie comme l'écologie des populations (distribution et abondances de mollusques hôtes intermédiaires), l'écologie parasitaire (données de prévalences naturelles de parasites chez les hôtes), la génétique des populations en utilisant des marqueurs microsatellites (tant pour le parasite que pour les mollusques hôtes), et des études de susceptibilité et de compatibilité douve/limnée.

En ce qui concerne la diversité génétique du parasite, une très haute diversité et une forte probabilité d'allofécundation ont été observées. En revanche, des différenciations significatives entre souches n'ont pas été trouvées. Les taux d'infection chez le bétail sont très élevés.

Pour ce qui est de la biologie des populations des limnées hôtes, on a cartographié la distribution des deux espèces présentes à Cuba : *Galba cubensis* qui est très répandue et *Pseudosuccinea columella* qui n'est présente que dans la partie centre-occidentale. Nous avons mis en évidence des différences concernant les types d'habitats préférés pour chaque espèce : *G. cubensis* est plus ubiquiste et se retrouve beaucoup plus dans les sites anthropisés.

L'étude des compatibilités douve/mollusque a révélé l'existence de populations avec une résistance naturelle à l'infection par *F. hepatica* chez la limnée *P. columella*. Ces populations sont génétiquement différenciées des populations sensibles. La plupart des populations sensibles sont monomorphes avec le même haplotype très répandu. En revanche, nous avons observé une diversité génétique plus importante chez *G. cubensis* qui suggère un temps évolutif plus ancien à Cuba. L'échantillonnage fait dans une zone où la fasciolose sévit fortement chez le bétail a révélé un très faible taux d'infection naturel chez les limnées, mais avec de fortes variations d'intensités. Différentes combinaisons douve/limnée sympatriques et allopatriques testées expérimentalement ont montré une compatibilité supérieure de *G. cubensis* qui suggère une meilleure adaptation aux souches de *F. hepatica* cubaines.

Les résultats obtenus montrent que la compréhension de la dynamique des maladies infectieuses ainsi que leur contrôle doivent s'appuyer sur des connaissances très solides de la biologie, écologie, génétique et évolution des systèmes hôtes – parasites.

**MOTS-CLÉS :** interaction hôte – parasite, écologie, génétique de populations, microsatellites, douve du foie, fasciolose, trématode, parasitologie, limnée, mollusque.

**DISCIPLINES :** biologie, évolution, écologie, génétique des populations, malacologie, parasitologie.

**INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :** MIVEGEC, UMR IRD 224 CNRS 5290 UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

---

## Abstract

**TITLE: Host – parasite interactions in an insular context: relationships between *Fasciola hepatica* (Trematoda) and the snails *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda) in the Island of Cuba**

---

### ABSTRACT

Host – parasite interactions are biological systems that probably affect every living being. It also constitutes a key factor in the understanding of infectious diseases. This subject has been studied using the *Fasciola hepatica*/Lymnaeidae system in the insular environment of Cuba. This thesis makes a biological multidisciplinary approach through population ecology (distribution and abundance of intermediary hosts snails), infection rates estimations of parasites in their hosts, population genetics using microsatellites markers (for both parasite and snails hosts), and studies of susceptibility and compatibility fluke/snail.

The genetic diversity of the parasite is characterized by high values of diversity as well as probability of cross fertilization. However, we failed to detect significant differences between the strains but a highly infection rate is shared in cattle.

Regarding the lymnaeid snails, the distribution of the two occurring species is mapped showing that *Galba cubensis* is widely distributed while *Pseudosuccinea columella* only exists in central-western Cuba. Both snail species differ in preferred habitat types and *G. cubensis* displays a higher ecological plasticity commonly observed in heavily human-transformed sites.

Differences in host-parasite compatibilities have been revealed. It has been noted the existence of some populations of *P. columella* with a natural resistance to *F. hepatica* infection which display a marked differentiation of their population genetic structure compared to susceptible populations. Most susceptible populations are monomorphic with a very common haplotype in Cuba. Conversely, we observed a higher diversity in *G. cubensis* indicating a larger evolutionary time in Cuba. The sampling conducted in a fasciolosis endemic area revealed very low prevalences in the snail populations. However, strong variation in parasite mean intensity within individuals supports the high infection rates observed in cattle. Different sympatric and allopatric fluke/snail combinations were experimentally tested in which *G. cubensis* proved to be more compatible and suggest a better adaptation to the circulating *F. hepatica* in Cuba.

Our results show that the understanding of infectious diseases' dynamics and their effective control must strictly rely in a full knowledge of the biology, ecology, genetics and evolution of host – parasite systems.

**KEY WORDS:** host – parasite interactions, ecology, population genetics, microsatellites, liver fluke, fasciolose, trematode, parasitology, lymnaeid snail, molluscs.

**DISCIPLINES:** biology, evolution, ecology, population genetics, malacology, parasitology.

**NAME AND ADDRESS OF LABORATORY:** MIVEGEC, UMR IRD 224 CNRS 5290 UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

## Resumen

**TÍTULO: Interacción hospedero – parásito en contexto insular: relaciones entre *Fasciola hepatica* (Trematoda) y los moluscos *Galba cubensis* y *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda) en la Isla de Cuba**

### RESUMEN

Las interacciones hospedero – parásito son sistemas que afectan probablemente a todos los seres vivos y constituyen un factor clave en la comprensión de la dinámica de las enfermedades infecciosas. Esta problemática ha sido abordada por medio del sistema *Fasciola hepatica*/Lymnaeidae en el contexto insular de Cuba. Esta tesis hace se acerca al tema basándose en diferentes disciplinas de la biología como la ecología de poblaciones (distribución y abundancia de moluscos hospederos intermediarios), ecología parasitaria (datos de prevalencia naturales en los hospederos), genética poblacional utilizando marcadores de microsatélites (tanto en el parásito como en los moluscos hospederos), y estudios de susceptibilidad y compatibilidad duela/limnea.

En relación a la diversidad genética del parásito, una alta diversidad y probabilidad de fecundación cruzada fueron encontradas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre aislados. Las tasas de infección en el ganado fueron muy elevadas.

En lo que concierne a los moluscos limnóideos, se mapeó la distribución de las dos especies presentes en Cuba: *Galba cubensis* es la más propagada mientras que *Pseudosuccinea columella* solo existe en la región centro-occidental. Se observaron diferencias en relación a los tipos de hábitat preferidos por cada especie: *G. cubensis* presenta una mayor plasticidad ecológica y es fácilmente adaptable a condiciones de fuerte antropización.

El estudio de compatibilidad duela/limnea reveló la existencia de poblaciones de *P. columella* con resistencia natural a la infección por *F. hepatica*. Estas poblaciones son genéticamente diferenciadas de las poblaciones susceptibles. La mayor parte de las poblaciones susceptibles son monomórficas con un haplotipo muy común. Sin embargo, se observó una mayor diversidad en *G. cubensis* que indica un mayor tiempo evolutivo en la Isla. El muestreo realizado en una zona endémica de fasciolosis mostró prevalencias naturales muy bajas en las poblaciones de los moluscos pero con fuertes variaciones observadas en la intensidad parasitaria. Diferentes combinaciones simpátricas y alopátricas de duelas/limneas probadas experimentalmente muestran una compatibilidad superior de *G. cubensis* que sugiere una mejor adaptación a las cepas circulantes de *F. hepatica* en Cuba.

Los resultados obtenidos indican que la comprensión de la dinámica de las enfermedades infecciosas, así como su control, deben apoyarse sobre conocimientos sólidos de la biología, ecología, genética y evolución de los sistemas hospedero – parásito.

**PALABRAS CLAVE:** interacción hospedero – parásito, ecología, genética de poblaciones, microsatélites, duela del hígado, fasciolosis, trematodo, parasitología, limnea, molusco.

**DISCIPLINAS:** biología, evolución, ecología, genética de poblaciones, malacología, parasitología.

**NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL LABORATORIO:** MIVEGEC, UMR IRD 224 CNRS 5290 UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.



---

## Remerciements

Je tiens à remercier, avant tout, les membres du jury pour avoir accepté de lire et évaluer cette thèse ainsi que pour leur présence à la soutenance. Merci au président Philippe Jarne et aux deux rapporteurs, Ghita Chlyeh et Benjamin Gourbal. Merci aussi à Nicolás Bonel d'avoir accepté de participer à ce jury.

La finalisation de cette thèse n'aurait pas pu se faire sans la contribution d'un grand nombre de personnes, qui m'ont aidé dès mes premières étapes de formation jusqu'à aujourd'hui. Par contre, trois personnes ont été particulièrement importantes pendant la réalisation de cette thèse de doctorat :

En premier lieu ma tutrice, Sylvie Hurtrez-Boussès, pour qui le mot tutrice est trop petit et je n'arrive pas à en trouver un pour la décrire. Sylvie est un des plus grands personnages que j'ai connus, et ça a été un honneur et un privilège d'apprendre avec elle. Ta capacité à être toujours à l'écoute et à prendre soin de chacun, malgré toutes les complications et moments difficiles, est une chose que j'estime grandement et que je n'oublierai jamais. Merci pour ce que tu m'as appris, pour m'avoir accueilli dans ta famille, pour ton aide sans limites et ta compréhension, pour m'aider à apprendre le français et la culture française. Mais surtout, merci pour ta rigueur scientifique et la formation que tu m'as donnée. *Un grand merci à toi, Sylvie !*

Après c'est Jean-Pierre Pointier, '*lo mejor en Malacología*'. Merci Jean-Pierre pour m'avoir si fortement aidé quand tout d'un coup je me suis trouvé tout seul comme responsable du labo de Malacologie à Cuba. Merci pour m'avoir présenté à Sylvie, pour ton exemple infatigable, pour venir nous voir à Cuba et partager de bons moments pendant toutes ces années, et pour me faire partager toutes tes connaissances sur les mollusques. Merci d'avoir toujours été attentif à cette thèse, de tes visites à Montpellier pour discuter sur tous les sujets de malacologie, pour tous

les articles et révisions avec tes commentaires si justes. Tu feras toujours partie intégrante de l'équipe de Malacologie de Cuba.

Et en troisième lieu se trouve Jorge Sánchez. Jorge, tu es probablement une des meilleures personnes qui existent et probablement que personne n'élève les mollusques aussi bien que toi, surtout quand on connaît les conditions dans notre labo ! (magie...). Merci pour tout, pour toutes ces années, pour avoir toujours des limnées prêtes, pour partager avec moi le travail sur le terrain et surtout les carences (c'est vrai que nous avons traversé des difficultés !). Merci d'être le seul qui connaît les caprices des *Biomphalaria*, *Melanoides* ou *Lymnaea*, et qui le fait avec plaisir. Merci de ton aide désintéressée dans ou en dehors du travail ; même si la vie a été si difficile, merci de faire partie de ma famille.

Merci à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et au Département Soutien et Formation pour la Bourse d'Echange Scientifique et Technologique (BEST) que j'ai obtenue et à partir de laquelle j'ai initié ma formation à Montpellier. Merci à Didier Fontenille et Frédéric Simard de m'avoir si bien accueilli dans leur laboratoire, et aux assistantes pour leur patience et leur sourire, en particulier à Francine Martin et Audrey Ravat qui ont géré mes dossiers et toutes sortes de tracasseries administratives. Jean-François Guégan et François Renaud m'ont intégré dans leurs équipes et m'ont permis de travailler dans d'excellentes conditions; je leur en suis très reconnaissant. Je remercie toute l'équipe de Mivegec pour son aide, spécialement Patrick Durand qui était toujours disponible à m'aider au labo, et Valérie Noël pour être son immense gentillesse. Merci à toutes les personnes qui ont toujours été attentives à moi pendant mes stages à l'IRD. Merci à Karen McCoy et à Marion Vittecoq pour leur participation à mon comité de thèse. Merci à Marion de m'avoir fait découvrir la Camargue et ses limnées.

Merci tout particulièrement à Manon Lounnas pour son aide infinie au labo et tout au long de ma thèse, pour tout ce qu'elle m'a appris et pour toutes nos discussions. Merci à Pilar Alda (Pili) pour son aide au labo, surtout avec les échantillons de *G. cubensis*, et à Nico pour les moments passés ensemble et les discussions. Merci aussi à Nicolas Bouzinbi et à Alexia Milesi avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. A tous les amis avec qui j'ai partagé d'excellents moments pendant les stages à l'IRD : Daniel Sanhueza, Romain Pigeault, Marlène Dupraz, Elsa Léger, Elsa Canard, Andrés Garchitorena, Kevin Carolan et Gabriel García. Je tiens aussi à remercier les personnes qui travaillent à la cantine de l'IRD pour leur accueil tous les jours et pour m'avoir fait découvrir différents plats de la cuisine française.

Merci à Patrice David et André Théron pour les moments pendant lesquels on a eu l'occasion de discuter. Merci à Jens E. Jelnes pour un des meilleurs voyages sur le terrain à Cuba (on a trouvé finalement les *columella* infestées à El Pilón !). Merci à Daisy Figueredo à Santiago de Cuba pour son aide logistique pour l'échantillonnage de toute cette région.

Je tiens à remercier tous les collègues du Département de Contrôle de Vecteurs, la vice-direction de Parasitologie et la direction générale de l'Institut de Médecine Tropicale à la Havane (IPK) pour leur soutien pendant les périodes de formation en France. A l'IPK, qui est ma deuxième maison depuis mon enfance.

A l'ancienne équipe de Malacologie qui m'a marqué dès que j'étais enfant : à China pour avoir été là quand le monde s'est arrêté, à Alfredito qui a été mon premier tuteur, à Ricardo et à Ferrer, à Pepuchó, vos empreintes existent encore au labo !

A tous ceux qui ont été mes étudiants et m'ont permis d'entrer dans le monde difficile de l'enseignement, surtout à ceux dont j'ai eu le privilège de diriger les stages de master ou diplôme d'université, particulièrement à Elizabeth qui est déjà la plus jeune de notre équipe de Malacologie à l'IPK.

Je tiens aussi à remercier, mais tout particulièrement, ma famille française, que depuis cinq ans j'ai vue s'agrandir. Je n'ai pas de mots assez forts pour vous dire toute la joie et tout le privilège que j'ai de vous connaître. Merci est vraiment un mot trop court mais je peux simplement vous dire que sans vous, cette thèse aurait été impossible : Merci aux Quatrefages, spécialement à Damien, toi qui m'as accueilli dans ta maison et m'as intégré dans ta famille ; merci pour toutes les discussions scientifiques, politiques et sportives, merci pour les matchs de la Ligue 1 au Stade de la Mosson, merci pour Saint Jean de Bruel, les vins et ta culture. Merci aussi à Renée, Claire, Nicolas et Eddy, je ne vous oublie pas. Merci à Claude et Claude (*les Claudes*) pour tous les moments partagés et pour m'accueillir si gentiment, merci à François et Lhan pour les moments vietnamiens si sympathiques. Une mention spéciale pour Nicolas Chevassus-au-Louis, un ami que je n'oublie pas ; merci pour la plage et pour m'avoir amené à l'escalade, pour le cinéma dans la rue, pour ton amabilité et ton amitié. Finalement, mille mercis de nouveau à Sylvie et toute sa famille ; merci à vous, tout a été beaucoup plus facile pour moi, merci à Iannis, Kiona, Soraya, Nahéma et Sabri pour être si gentils avec moi. Merci Jean-Emmanuel, pour les moments partagés, je ne t'oublierai jamais ! Merci Prades-le-Lez, Celleneuve, Montpellier, merci la France !

Merci à mes amis qui sont mes frères, en particulier Fernandito pour m'avoir supporté depuis l'école maternelle, pour tout ce que nous avons partagé et tout ce que j'ai appris de toi, pour les meilleurs moments et aussi pour les plus difficiles. A Eduardito pour être toujours là, toujours prêt à tout. Merci à Dorka pour les mollusques de Guanhacabibes. Merci à Anselmo de toujours te préoccuper de ma thèse. Merci à Adonis pour partager le travail sur le terrain à chercher des limnées.

Ma famille a été toujours la colonne indispensable de ma formation : Abuelo Mel m'a montré tout ce qu'un homme doit savoir faire chez lui, Abuelo Ñico m'a

enseigné la lecture et l'écriture (je me souviens encore des sessions de calligraphie et de lecture du *Quijote de la Mancha* avant d'aller jouer !). Merci à Tío Tony pour toute ton aide et pour me servir d'exemple. Je tiens à remercier spécialement Susanita, pour être toujours restée à mes côtés, pour tout ce que nous partageons et pour être plus qu'une cousine, une sœur. Merci à Camila qui est exceptionnelle. Merci à mon frère, à cause des caprices de la vie nous avons été ensemble puis séparés, mais tu es une des meilleures personnes qui existent. Merci à toute la famille, à tous ceux qui ne sont plus parce qu'ils ont partis trop tôt mais que je n'oublie pas ; merci Abuela Nela et Abuela Llilla. Merci à ma mère et à mon père pour avoir été les piliers de ce que je suis, pour m'avoir fait grandir et m'avoir appris à affronter la vie.

Merci à mes beaux-parents, María et Emiliano qui m'accueillez comme votre fils, pour votre aide incessante et votre exemple, mais surtout pour m'avoir confié votre trésor le plus estimé.

Ma femme Annia est pour moi un soutien sans faille. Merci de ton amour, ta compréhension, ton dévouement et ta patience. Pardon pour les périodes difficiles de séparation pendant mes séjours en France chaque année ; la distance nous met à l'épreuve, mais renforce les sentiments. Tu es tout simplement merveilleuse. Et aussi, merci pour tes commentaires critiques et tes idées pendant le déroulement de cette thèse, à laquelle tu es totalement associée.

*Finalmente, lo que he logrado con esta tesis está dedicado a las tres mujeres más importantes en mi vida: a mi Mamá, por abrirme los ojos, por su ejemplo, por tantas cosas... por todo... y por seguir aquí siempre conmigo; a Abuela Nela, porque me formó en muchos aspectos y por ser en gran medida responsable de que hoy me haya hecho científico; y a mi esposa Annia, a la que a veces no digo todo lo que debería porque las palabras no me salen como los textos, pero que es mi ejemplo en la ciencia y en la vida.*

*A todos, ¡gracias !*



---

## Avant-propos

Cette thèse porte sur un des sujets centraux en biologie évolutive, mais est en même temps directement liée à l'épidémiologie des maladies tropicales : les interactions hôtes – parasites. Ici, on étude particulièrement les relations entre des petits mollusques d'eau douce de la famille Lymnaeidae et la grande douve du foie *Fasciola hepatica*. Pour étudier cette problématique, on a profité de la situation particulière de l'île de Cuba, un endroit très touché par la douve, mais qui, du fait de son insularité, bénéficie d'une réduction naturelle de variables biologiques comme le nombre d'hôtes définitifs et intermédiaires. L'approche intègre différents types d'études, en combinant des études de prévalences naturelles, d'écologie sur le terrain, de génétique des populations, et de susceptibilité/compatibilité de combinaisons sympatriques et allopatriques des mollusques et douves.

La thèse est divisée en trois chapitres qui contiennent les principaux résultats obtenus et constituent les axes fondamentaux de recherche, précédés d'une introduction générale et suivis d'une discussion générale qui essaie de mettre en relation les aboutissements scientifiques avec le contrôle de la fasciolose. Tout cela est suivi d'une petite partie correspondant aux conclusions et perspectives de travail.



---

# Introduction

## Les interactions hôtes-parasites

L'étude des relations entre les hôtes et les parasites est un point d'intérêt central en biologie évolutive (Joachim *et al.* 2001) et est indispensable pour comprendre la dynamique des maladies infectieuses (Hawley et Altizer, 2011). La coévolution des interactions hôtes-parasites résulte d'une sélection naturelle réciproque entre la résistance de l'hôte et la virulence du parasite (Thompson, 1994). Ce type de sélection explique comment les parasites sont sélectionnés de façon à ce qu'ils surmontent la résistance de leurs hôtes. Par conséquent, les hôtes possédant des gènes rares de résistance ont un avantage sélectif (Hamilton *et al.* 1990). En théorie, cet avantage sélectif, tant pour les hôtes que pour les parasites, favorise la reproduction sexuée car elle produit une descendance plus diversifiée génétiquement. Ce principe est connu comme la Théorie de la Reine Rouge et a été utilisé pour expliquer les variations de fréquences alléliques dans les systèmes hôtes-parasites (Van Valen, 1973). L'existence de variations génétiques dans la résistance de l'hôte et la virulence du parasite, ainsi que la spécificité de génotypes particuliers de virulence des parasites envers des génotypes particuliers d'hôtes, sont des prérequis nécessaires au fonctionnement de ce modèle (Joachim *et al.* 2001).

Dans le contexte de la Reine Rouge, les interactions hôtes-parasites peuvent aboutir à une adaptation locale entre les hôtes et les parasites (Gandon et van Zandt, 1998 ; Dybdahl et Storfer, 2003). Les effets directs d'une coévolution entre hôtes et parasites sont très liés à l'évolution de la virulence et de l'infectivité, ainsi qu'à la propagation des maladies infectieuses (Nuismer et Otto, 2005).

Aucune relation hôte-parasite ne peut être séparée des changements naturels ou anthropiques de l'environnement. Plusieurs espèces de parasites sont utilisées comme bio-indicateurs des impacts dans les écosystèmes (Vidal-Martínez *et al.* 2010). Différents types d'environnement dans lesquels les hôtes ont une interaction avec les parasites affectent fortement la spécificité et la sélection de génotypes (Wolinska et King, 2009). En ce qui concerne les interactions hôtes-parasites, la probabilité d'infection ainsi que

la virulence dépendent de facteurs particuliers de l'environnement (Sandland et Minchella, 2003).

Les parasitoses liées à l'eau sont un des modèles les plus intéressants dans les systèmes hôte-parasite-environnement. En effet, ce sont les maladies qui affectent le plus fortement les populations humaines dans les pays pauvres, et pour lesquelles il est urgent d'approfondir la connaissance de leur épidémiologie. Beaucoup de ces parasitoses sont causées par un parasite Digène (Plathelminthe, Trématode) qui utilise un mollusque aquatique comme hôte intermédiaire dans son cycle de vie. Les exemples les plus connus de ces systèmes mollusque/trématode sont les Planorbidae/*Schistosoma* spp., les Hydrobiidae/*Paragonimus* spp. et les Lymnaeidae/*Fasciola* spp. Les mollusques de cette dernière famille jouent un rôle très important dans la transmission d'au moins 71 espèces de trématodes appartenant à 13 familles différentes (Bargues *et al.* 2001). Un des systèmes les plus intéressants est précisément celui des Lymnaeidae/*Fasciola hepatica*.

### **Les maladies transmises par les mollusques d'eau douce: l'exemple de la fasciolose**

La majorité, et probablement la totalité des êtres vivants sont, au moins durant une partie de leur vie, affectés par des parasites qui sont responsables d'une grande diversité de maladies. Les êtres humains n'échappent pas à cette règle et un certain nombre de parasitoses ont été décrites partout dans le monde (Polley et Thompson, 2009). Un des groupes de parasitoses les plus importants est celui des parasitoses tropicales, qui affectent profondément les pays en voie de développement (OMS, 2013). Parmi ces maladies, quelques-unes ont été considérées comme prioritaires au niveau mondial et sont la cible de programmes financés destinés à les étudier et les contrôler. C'est par exemple le cas du paludisme, de la tuberculose ou du choléra (Molyneux et Malecela, 2011). En revanche, il existe un groupe de maladies qui n'ont pas fait l'objet du même intérêt et qui ont été cataloguées comme « maladies tropicales négligées » (MTN) par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Dans cette catégorie se trouvent des maladies qui ont une large distribution et des prévalences élevées dans les régions pauvres, telles que la dengue, la maladie de Chagas, la leishmaniose, l'onchocercose etc. (Liese *et al.* 2010). C'est également le cas de toute une gamme de maladies liées à l'eau

ou à l'alimentation, comme les schistosomoses ou la fasciolose. La liste complète des MTN établie par l'OMS (OMS, 2013) est résumée dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Maladies tropicales négligées selon l'OMS (2013).

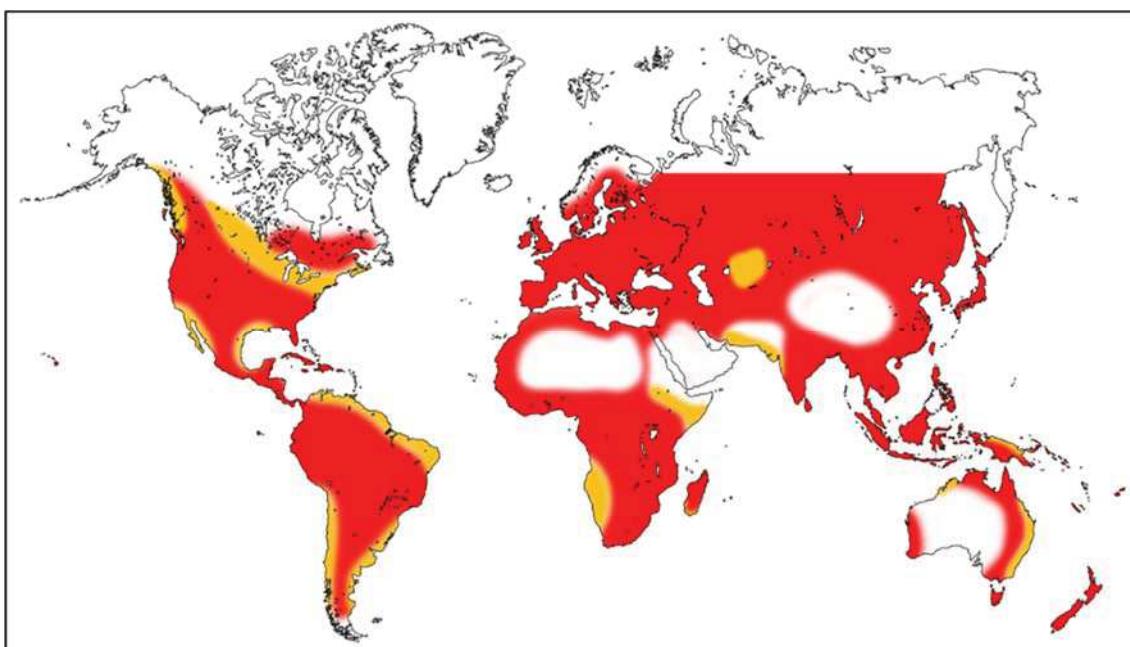
Pathogène	Maladie	Vecteur/Hôte	Personnes infectées
Virus	Dengue	Moustiques	50-100 M
	Rage	Mammifères	60 000
Bactérie	Ulcère de Buruli	-	inconnu
	Lèpre	-	190 000
	Trachome	-	84 M
	Pian (Framboesia)	-	inconnu
Protozoaires	Maladie de Chagas	Triatomés	8 M
	Maladie du sommeil	Mouche <i>Tsé-Tsé</i>	30 000
	Leishmanioses	Phlébotomes	1,3 M
Helminthes	Cysticercoses/Taenioses	Mammifères	50 M
	Dracunculose	Crustacés	146
	Echinococcosse	Mammifères	1 M
	Trématodes liées aux aliments (Fasciolose, Clonorchiase, Opistorchiase, Paragonimose)	Mollusques	56 M
	Filariose lymphatique	Moustiques	120 M
	Onchocercose	Simulies	37 M
	Schistosomose	Mollusques	240 M
	Helminthiases de la terre	-	880 M

Devant une telle situation, il est d'importance capitale que les programmes de lutte et de contrôle s'appuient sur des connaissances très solides de la biologie, de l'écologie et de l'évolution des systèmes hôtes-parasites. Or, ces systèmes parasitaires peuvent être directement ou indirectement affectés par les conditions environnementales dans lesquelles ils se développent. Les variations environnementales peuvent altérer la dynamique épidémiologique (changements dans les densités des hôtes et des vecteurs) et l'efficacité de la transmission, et peuvent modifier les interactions dans les systèmes hôte-parasite (Wolinska et King, 2009). L'épidémiologie de ces maladies est de cette manière indissociable des études sur les interactions hôte-parasite-environnement.

### Importance de la fasciolose au niveau mondial

Parmi les Maladies Tropicales Négligées, la fasciolose s'inscrit comme un des sujets d'intérêt croissant du point de vue médical et vétérinaire (WHO, 2007). Cette maladie, transmise par des mollusques, est causée par les espèces de Digènes hermaphrodites *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 et *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 (Platyhelminthes : Trematoda : Digenea). Leur transmission est fortement liée à la présence de mollusques de la famille des Lymnaeidae Rafinesque, 1815. Les adultes de *Fasciola* spp. vivent dans les canaux biliaires du foie de plusieurs mammifères mais les larves doivent passer obligatoirement par des mollusques hôtes intermédiaires avant de s'établir dans le nouvel hôte définitif. Les animaux domestiques sont habituellement les plus infectés mais cependant, il est intéressant de noter que quelques petites espèces de mammifères (notamment rongeurs) peuvent avoir un rôle important comme réservoirs du parasite dans la nature (Ménard *et al.* 2000 ; 2001).

Du point de vue épidémiologique, la fasciolose est considérée comme une parasitose à très large distribution latitudinale, longitudinale et altitudinale des régions tropicales et tempérées (Mas-Coma *et al.* 2009) (figure 1). Les deux espèces de douves peuvent infecter un large spectre de mammifères hôtes définitifs incluant l'Homme (Hurtrez-Boussès *et al.* 2001). Toutefois, alors que *F. gigantica* est restreinte à l'Afrique et l'Asie, *F. hepatica* appelée également grande douve du foie, est cosmopolite. Elle affecte sévèrement le bétail (surtout ovins et bovins) partout dans le monde mais a aussi un impact important sur les populations humaines (Mas-Coma *et al.* 2005) dans certaines zones endémiques, voire hyper-endémiques (Iran, Egypte, Pérou et surtout Bolivie).



**Figure 1.** Distribution mondiale de la fasciolose par *Fasciola hepatica* et *Fasciola gigantica* (adapté de OMS, 2013). Les régions avec des prévalences estimées sont en rouge. En jaune ce sont les régions potentielles où sont présents les mollusques hôtes intermédiaires.

Plusieurs pays ont décrit l'apparition de la fasciolose dans des zones où elle n'existant pas auparavant (émergence), alors que d'autres pays décrivent la réémergence de cette parasitose dans des zones déjà sous contrôle (Arjona *et al.* 1995). L'OMS estime à plus de 2.4 millions le nombre de personnes infectées et à près de 180 millions le nombre de personnes à risque. En dépit de cette situation les *Fasciola* spp. sont placées dans un groupe connu comme les "plus négligés" parmi les parasites déjà négligés (WHO, 2007). Tandis que ces chiffres se maintiennent ou augmentent du point de vue médical, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture s'intéresse au problème que la fasciolose pose pour l'élevage du bétail (FAO, 2003). Des études rapportant des cas d'animaux infectés et utilisés pour l'alimentation, pour les travaux agricoles ou pour le transport sont de plus en plus fréquentes. Cette maladie du bétail mais aussi de l'Homme est reconnue comme un important problème dans quelques pays européens (Rondelaud *et al.* 2005) mais surtout en Egypte (Haridy *et al.* 1999; Haseeb *et al.* 2002; Esteban *et al.* 2003) et sur l'Altiplano Bolivien (Esteban *et al.* 1997; Fuentes, 2006). Dans d'autres pays comme l'Argentine et l'Espagne, le bétail est fortement infecté par *F. hepatica* mais les cas humains sont très rares (Paz-Silva *et al.* 2003; Kleiman *et al.* 2007). En Asie, quelques régions d'Iran et du Vietnam montrent des prévalences très élevées tant par *F. hepatica* que par *F. gigantica* dont des formes hybrides ont été

décrivées, ce qui rend plus complexe encore le scénario de transmission (Rokni, 2008; Nguyen *et al.* 2011).

Comme la plupart des maladies transmises par des vecteurs, les épidémies de fasciolose à petite ou à grande échelle, dépendent de plusieurs facteurs essentiels étroitement liés comme les interactions hôtes-parasites, la manipulation des hôtes définitifs (le bétail), et les conditions socio-environnementales. Bien que la fasciolose animale ne semble pas directement liée aux modifications anthropiques, les plus forts taux d'infection chez les hôtes intermédiaires et définitifs sont enregistrés dans des zones fortement anthropisées (Mas-Coma *et al.* 2005).

### **Biologie des douves du foie : le cycle de vie de *Fasciola* spp.**

Outre *F. hepatica* et *F. gigantica*, deux autres espèces de *Fasciola*, *F. nyanzae* Leiper, 1910 et *F. jacksoni* Cobbold, 1869, ont une distribution limitée et très spécifique à certains hôtes définitifs (hippopotame chez *F. nyanzae* et éléphant chez *F. jacksoni*) (Dinnik et Dinnik, 1961 ; Caple *et al.* 1978). En revanche, et en accord avec les résultats phylogénétiques de Lotfy *et al.* (2008) et Heneberg (2013) l'espèce *F. jacksoni* est très proche de *Fascioloides magna* et doit être considérée comme appartenant à ce dernier genre.

Le cycle de vie de *Fasciola* spp. est hétéroxène en comportant un hôte intermédiaire et un hôte définitif (figure 2). Les parasites adultes vivent dans les canaux biliaires du foie des mammifères où leur reproduction sexuée a lieu. Approximativement 40 000 œufs par parasite sont pondus tous les jours et sont éliminés dans le milieu extérieur avec les selles. Quand les conditions de température et d'humidité sont favorables, les œufs peuvent éclore après 14 à 20 jours de développement (Vignoles *et al.* 2001 ; Souza *et al.* 2002). Une larve appelée miracidium sort de chaque œuf et, dans les 24h, doit trouver un mollusque, une limnée, susceptible de s'infecter (Andrews, 1999). Le miracidium peut nager vers les limnées qui sont généralement à la surface de l'eau grâce à son phototropisme positif, puis à un chimiotaxisme une fois qu'il est proche des limnées (Wilson et Denison, 1970). Les larves pénètrent les mollusques au niveau de la partie supérieure de la tête, du pied ou du manteau. Une fois pénétré à l'intérieur de la limnée, la métamorphose aboutit au sporocyste en 24 heures (Wilson *et al.* 1971). Cette étape peut durer 2 à 3 jours et les rédies peuvent se multiplier et produire d'autres

rédies de deuxième génération (Rondelaud *et al.* 2009). Finalement, chaque rédie produit entre 8 et 10 cercaires. Ces étapes font partie de la reproduction asexuée du parasite et sont très dépendantes de la compatibilité avec la limnée hôte (Vázquez *et al.* 2014).

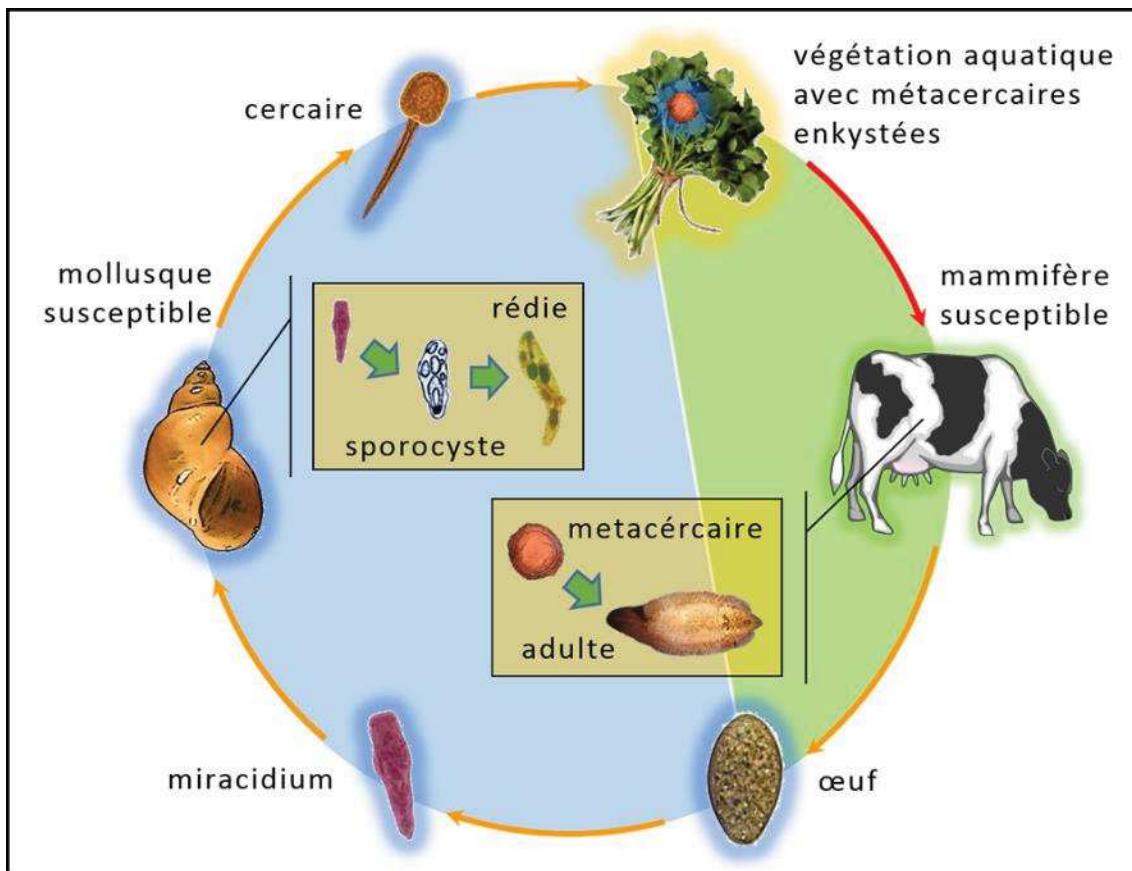


Figure 2. Cycle de vie de *Fasciola* spp.

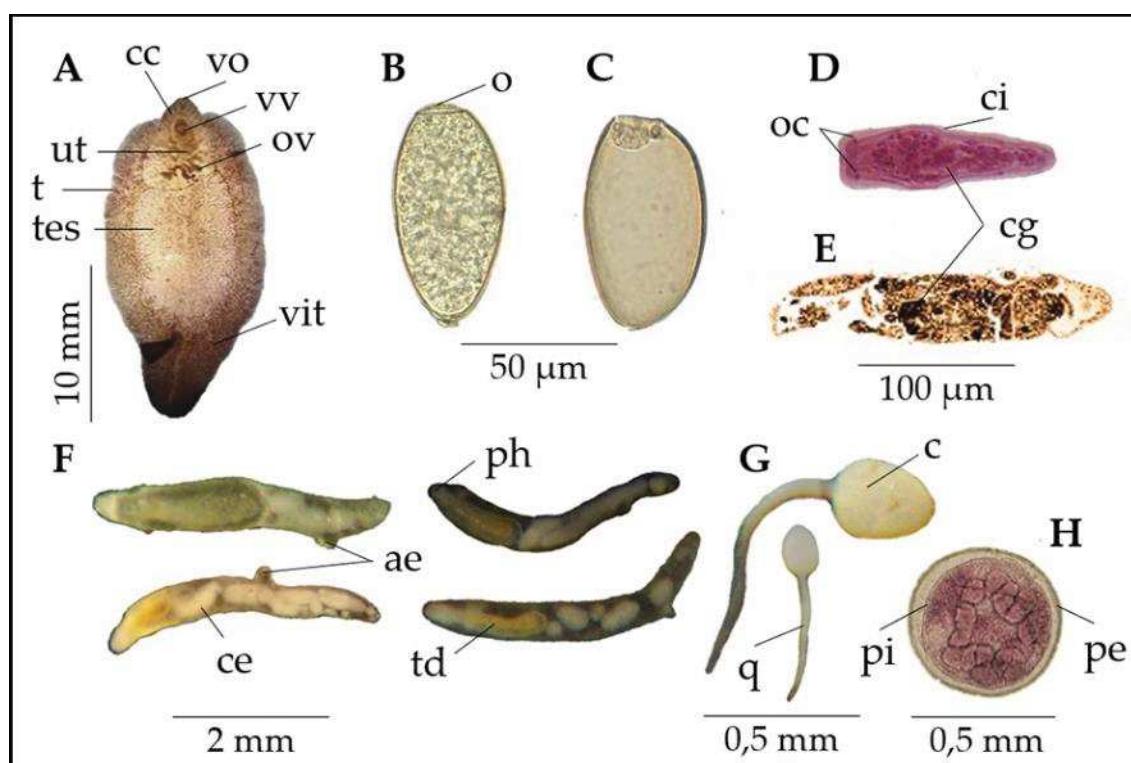
L'émission des cercaires peut avoir lieu aussi bien de jour que de nuit. Les conditions environnementales ainsi que celles du mollusque peuvent influer sur le temps de formation et l'émission des cercaires (Novobliský *et al.* 2013). La période de maturation (période prépatente) peut varier de 38 à 86 jours selon les conditions environnementales (Mas-Coma, 2005).

Quand les cercaires sont matures, elles sortent de la limnée mais leur élimination dans le milieu extérieur peut fragiliser le mollusque (Gutiérrez *et al.* 2000). Les cercaires nagent dans l'eau et s'enkystent dans la végétation aquatique ou semi-aquatique (Dreyfuss *et al.* 2004) ou sur une surface solide et se transforment en métacercaires. Des métacercaires flottantes à la surface de l'eau ont été aussi mises en évidence (Dreyfuss *et al.* 2006). Les mammifères susceptibles s'infestent en avalant les métacercaires avec

l'eau ou la végétation. Un parasite juvénile se forme dans le duodénum et migre vers le foie où il s'établit et devient sexuellement mature. Un parasite adulte de *F. hepatica* peut vivre jusqu'à 15 ans chez certains hôtes (Andrews, 1999). Bien que les douves soient des parasites hermaphrodites, les adultes se reproduisent le plus souvent par allofécondation (Hurtrez-Boussès *et al.* 2004 ; Mas-Coma, 2005 ; Vilas *et al.* 2012 ; Cwiklinski *et al.* 2015).

#### Caractéristiques générales des différents stades de développement des douves du foie

Les différents stades de développement des douves du foie sont très similaires à ceux du reste des digènes (Hickman *et al.* 2001). A la différence de quelques trématodes digènes, une métacercaire est formée après que la cercaire ait quitté le mollusque (figure 3).



**Figure 3.** Caractéristiques générales des différentes phases de développement de *Fasciola hepatica*. A = adulte (cc: cône céphalique, ov: ovaire, t: tégument, tes: testicules, ut: utérus, vit: vitellum, vo: ventouse orale, vv: ventouse ventrale); B = œuf embryonné (o: opercule); C = œuf éclos; D = miracidium (cg: masses germinales, ci: cils, oc: ocelles); E = sporocyste; F = rédies (ae: appendices évaginés, ce: cercaires, ph: pharynx, td: tractus digestif); G = cercaires (c: corps, q: queue); H = métacercaire (pe: paroi extérieure, pi: paroi intérieure). Photos A.A. Vázquez.

### *Adultes*

Les adultes de *Fasciola* sont des trématodes caractérisés par une bouche en position antérieure, un pharynx et un intestin ramifié en deux branches. Deux ventouses, une en position orale (incorporant la bouche) et l'autre sur la partie ventrale (acétabulum) aident à la fixation et la locomotion de l'animal adulte (figure 3A). La ventouse orale se trouve à la base du cône céphalique (Jones, 2005). Le parasite adulte a une forme de feuille plus ou moins allongée et dont les dimensions varient selon l'espèce. Les dimensions des adultes sont de 20 à 30 mm de longueur et 8 à 12 mm de largeur (Andrews, 1999). Des études morphologiques montrent une nette différenciation entre *F. hepatica* et *F. gigantica*, ainsi qu'entre des formes hybrides dans quelques régions asiatiques (Afshan *et al.* 2013 ; Valero *et al.* 2012). Toutefois, dans les zones de sympatrie, des morphes intermédiaires existent et rendent la détermination sur critères morphologiques impossible (Lotfy *et al.* 2008; Ashrafi *et al.* 2006; Periago *et al.* 2008). Un ovaire sous-médian généralement à droite est caractéristique. Le tégument est couvert de petites épines. Les adultes peuvent se nourrir du sang de l'hôte définitif et d'autres éléments nutritifs apportés par la bile (Andrews, 1999).

### *Œufs*

Les œufs mesurent 115 à 120 µm de longueur et 55 à 60 µm de largeur (figure 3B,C). A l'une des extrémités un opercule est présent et s'ouvre au moment de l'éclosion à cause la pression interne de la larve (Andrews, 1999).

### *Miracidia*

Les miracidia ont une forme conique et tout le corps est couvert de cellules ciliées qui aident à la locomotion (figure 3D). La lumière est le facteur le plus important pour l'activation du miracidium mais les variations abruptes de température sont aussi des stimuli efficaces. Cette larve n'a pas de système digestif et deux yeux simples sont protégés par des pigments (Andrews, 1999).

### *Sporocystes*

Les sporocystes produisent des rédies qui sont la forme larvaire qui vit le plus longtemps dans la limnée (Andrews, 1999) (figure 3E). Les sporocystes migrent vers la glande digestive en utilisant le système circulatoire de la limnée (Magalhães *et al.* 2008).

### Réadies

Les réadies peuvent atteindre une longueur d'environ 1 mm et présentent un pharynx utilisé pour la nutrition (figure 3F). Des études ont montré que les réadies de *F. hepatica* peuvent ingérer et éliminer les larves d'autres digènes comme *Paramphistomum* spp. (Kearn, 1998). Les réadies peuvent produire 2-3 générations de réadies filles ou de cercaires à température ambiante (Rondelaud *et al.* 2009).

### Cercaires

La cercaire de *Fasciola* spp. est une forme typique de *Gymnocephalous cercariae* (Frandsen et Christinsen, 1984). La queue est simple et le corps n'a ni stylet ni collier épineux (figure 3G).

### Métacercaires

La métacercaire enkystée forme une capsule avec une double paroi (figure 3H). Les kystes qui survivent longtemps augmentent ainsi la probabilité d'être consommés par l'hôte définitif. Quand les kystes sont ingérés par les hôtes vertébrés, les couches de la paroi interne protègent la métacercaire de l'environnement chimique pendant sa traversée de l'estomac. La sortie du kyste est un processus actif par action mécanique. Le stimulus le plus important est le dioxyde de carbone à 39°C. Les douves juvéniles récemment désenkystées migrent pour une transformation totale dans le parenchyme du foie (Andrews, 1999).

### Diversité d'hôtes définitifs

Si l'on considère le large spectre d'hôtes définitifs (voir pour revue Hurtrez-Boussès *et al.* 2001), *F. hepatica* est un parasite généraliste, caractéristique qui lui a probablement permis de s'établir dans le monde entier (Mas-Coma *et al.* 2009). Cette espèce a été identifiée pour la première fois chez le mouton mais peut parasiter une grande variété de mammifères herbivores et occasionnellement omnivores comme l'Homme (Andrews, 1999) et très rarement des oiseaux (Vaughan *et al.* 1997). En dehors du mouton, ce trématode infeste les vaches, les buffles, et les porcs (Mas-Coma *et al.* 2009), ainsi que les ânes et plus rarement les chevaux (Alves *et al.* 1988, Hardy *et al.* 2002). Chez les animaux sauvages, *F. hepatica* a été signalée chez les cerfs (Shimalov et Shimalov, 2000), les rats (Mas-Coma *et al.* 1987), les loutres (Valero *et al.* 2002), les

ragondins et les lapins (Ménard *et al.* 2000). On retrouve également *F. hepatica* chez des mammifères autochtones comme les lamas et les alpacas des Andes sud-américaines (Cornik, 1988 ; Neyra *et al.* 2002) et les marsupiaux en Australie (Spratt et Presidente, 1981). Dans le cas de *F. gigantica* les chameaux en Afrique jouent aussi le rôle d'hôtes définitifs (Hardy et Morsy, 2000).

### **Les mollusques hôtes intermédiaires de *Fasciola* spp.**

Bien que la fasciolose soit largement répartie dans le monde, les prévalences sont très variables et dépendent de la présence des espèces de mollusques hôtes intermédiaires. Les mollusques de la famille Lymnaeidae, servent d'hôtes intermédiaires aux *Fasciola* spp. Les limnées sont très bien représentées sur tous les continents. Ce sont des mollusques pulmonés (Mollusca : Gastropoda : Heterobranchia) qui n'utilisent pas de branchies pour la respiration mais une paroi vascularisée (poumon) qui permet les échanges gazeux. Toutes les espèces sont hermaphrodites et peuvent se reproduire par autofécondation ou allofécondation. Les limnées sont présentes des régions tropicales aux régions tempérées ou même froides (Caron *et al.* 2007 ; Correa *et al.* 2011 ; Vinarski, 2011). A l'exception de l'espèce *Pseudisidora productata* (endémique de Hawaii), la coquille des limnées est dextre et les tentacules sont généralement triangulaires et aplatis (Pouslednik, 2006).

On pense aujourd'hui que cette famille comprend une centaine d'espèces (Correa *et al.* 2010), bien que près de 1200 taxons aient été décrits dans le monde (Hubendick, 1951 ; Burch, 1982). La famille des Lymnaeidae a fait l'objet récemment de plusieurs études taxonomiques et phylogénétiques à cause de l'importance de ces espèces dans la transmission de la fasciolose (Bargues *et al.* 2007; Correa *et al.* 2010; Vinarski, 2013). Selon Vinarski (2013), les limnées se divisent en deux sous-familles, Lymnaeinae (16 genres) et Radicinae (10 genres).

### **Transmission de *Fasciola* spp. par les limnées à échelle mondiale**

Quelques genres de limnées sont connus pour être les principaux vecteurs de chacune des espèces de *Fasciola*. Le groupe des *Galba* est plus relié à *F. hepatica* tandis que le groupe de *Radix* est généralement relié à *F. gigantica* (Bargues et Mas-Coma, 2005). Cependant, les préférences écologiques plutôt que l'affinité phylogénique peuvent expliquer le pattern de spécificité des hôtes par *Fasciola* spp. dans différents régions (Lotfy *et al.* 2008).

Dans le genre *Galba*, *G. truncatula* est l'espèce hôte la plus importante dans la transmission de *F. hepatica* à l'échelle mondiale (Bargues et al. 2012). Cette espèce est très répandue en Europe (Caron et al. 2014), en Afrique du Nord (Mekroud et al. 2006) et en Amérique du Sud (Pointier et al. 2009). D'autres espèces sont aussi importantes comme *G. cubensis* dans la région Caraïbe (Vázquez et al. 2014 ; Pointier, 2008), *Pseudosuccinea columella* au Brésil (Magalhães et al. 2004) et aux États-Unis (Cruz-Reyes et Malek, 1987), *Galba viatrix* en Amérique du Sud (Cucher et al. 2006) et *Austropeplea tomentosa* en Australie (Molloy et Anderson, 2006). Dans le cas de *F. gigantica*, l'espèce *Radix natalensis* est considérée comme l'hôte le plus important en Afrique (Lotfy et al. 2008) tandis que *Radix rubiginosa* est responsable de la transmission dans le Sud-Est asiatique (Kaset et al. 2010). Les espèces de limnées dont la capacité de transmettre *Fasciola* spp. est connue sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Genres et espèces de limnées étudiées avec la capacité de transmettre *Fasciola hepatica* (Fh) ou *Fasciola gigantica* (Fg) dans le monde (espèces marquées\* signifie que l'infection n'a été testée qu'expérimentalement).

Espèce de limnée	Localité type	Distribution	Référence
<i>Austropeplea tomentosa</i> (Pfeiffer, 1855)	Auckland (Nouvelle Zélande)	Australie	Molloy et Anderson (2006)
<i>Galba cousinsi</i> (Jousseaume, 1887)	Chanchu-Yacu (Equateur)	Equateur (Fh) Colombie (Fh) Venezuela (Fh)	Pointier et al. (2004) Velásquez (2006)
		Cuba (Fh)	Vázquez et al. (2014)
		Etats-Unis (Fh)	Olsen (1944)
		Porto Rico (Fh)	Cruz-Reyes et Malek (1987)
<i>Galba cubensis</i> (Pfeiffer, 1839)	Cuba	Antilles (Fh) Colombie (Fh) Mexico (Fh) Uruguay (Fh) Venezuela (Fh)	Hoffman (1930) Gretillat (1966) Petitclerc et Barré (1986) Pointier et al. (2008) Correa et al. (2010) Morales et Pino (1983)
<i>Galba humilis</i> (Say, 1822)	South Carolina (USA)	Mexico (Fh)	Cruz-Mendoza et al. (2004)
<i>Galba modicella</i> (Say, 1825)	Owego, New York (USA)	Etats-Unis (Fh)	Rognlie et al. (1996)
<i>Galba neotropica</i> (Bargues et al., 2007)	Canals, Río Rimac (Pérou)	Argentine (Fh) Pérou (Fh)	Bargues et al. (2007) Mera y Sierra et al. (2009)

**Tableau 2. (suite)**

<b>Espèce de limnée</b>	<b>Localité type</b>	<b>Distribution</b>	<b>Référence</b>
<i>Galba schirazensis*</i> (Bargues et al. 2012)	La Trampa, Mérida (Venezuela)	Colombie (Fh) Venezuela (Fh) Mexique (Fh) Equateur (Fh)	Correa et al. (2011) Dreyfuss et al. (2015)* Caron et al. (2015)
<i>Galba truncatula</i> (Müller, 1774)	Thangelstedt (Allemagne)	Amérique du Sud (Fh) Afrique (Fg) Îles Britanniques (Fh) Europe (Fh) Argentine (Fh)	Meunier et al. (2001) Durand et al. (2002) Dar et al. (2002) Pointier et al. (2009) Relf et al. (2011)
<i>Galba viator</i> (d'Orbigny, 1835)	Río Negro (Argentine)	Brésil (Fh) Pérou (Fh) Uruguay (Fh)	Kleinman et al. (2004) Carvalho et al. (2004)
<i>Galba viridis</i> (Quoy et Gaimard, 1832)	Guam	Hawaii (Fh) Micronésie (Fh) Australie (Fh)	Cowie (1997) Kerr (2013) Molloy et Anderson (2006)
<i>Galba bulimoides</i> (Lea, 1841)	Oregon (USA)	Etats-Unis (Fh)	Foreyt et Todd (1978)
<i>Lymnaea diaphana</i> (King, 1830)	San Gregorio (Chili)	Argentine (Fh) Chili (Fh) Pérou (Fh)	Larrea et al. (1994) Bargues et al. (2012) Duffy et al. (2009)
<i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	Europe (Fh)	Bargues et Mas-Coma (2005)
<i>Myxas glutinosa*</i> (Müller, 1774)	Fridrichsdal (Denmark)	Sibérie (Fh)	Vinarski et al. (2013)*
<i>Omphiscola glabra</i> (Müller, 1774)	Fridrichsdal (Denmark)	France (Fh)	Dreyfuss et al. (2003)
<i>Pseudosuccinea columella</i> (Say, 1817)	Philadelphia (Etats Unis)	Cuba (Fh) Etats-Unis (Fh) Amérique du Sud (Fh) France (Fh) Afrique (Fh) Asie (Fh) Australie (Fh) Nouvelle Zélande (Fh)	Pullan et Whitten (1972) Malek et Cogswell (1980) Gutiérrez et al. (2011) Prepelitchi et al. (2003) Molloy et Anderson (2006) Pointier et al. (2007)
<i>Radix auricularia</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	Europe (Fg) Oman (Fg)	Afshan et al. (2013)

**Tableau 2. (Suite)**

Espèce de limnée	Localité type	Distribution	Référence
<i>Radix bactriana</i> (Annadale et Prashad, 1919)	Quetta (Afghanistan)	Turkménistan (Fg)	Bargues et Mas-Coma (2005)
<i>Radix balthica</i> (Linnaeus, 1758)	Baltic Sea littoral	Europe (Fh)	Caron <i>et al.</i> (2014)
<i>Radix euphratica</i> (Mousson, 1874)	Samava (Mésopotamie)	Iraq (Fg)	Bargues et Mas-Coma (2005)
<i>Radix gedrosiana</i> (Annadale et Prashad, 1919)	Chamal, Quetta, Kandahar, Seistan (Afghanistan)	Iran (Fg)	Ashrafi <i>et al.</i> (2004)
<i>Radix labiata*</i> (Rossmaessler, 1835)		Europe (Fh) Turquie (Fh) Urals (Fh)	Caron <i>et al.</i> (2007)*
<i>Radix lagotis</i> (Schrank, 1803)	Fleuve Danube (Allemagne)	Europe (Fh) (Danube bassin)	Bank (2011)
<i>Radix luteola</i> (Lamarck, 1822)	Bengale (Inde)	Népal (Fg)	Bargues et Mas-Coma (2005)
<i>Radix natalensis</i> (Krauss, 1848)	Port Natal (Afrique du Sud)	Afrique (Fh, Fg)	Dar <i>et al.</i> (2010) Lotfy <i>et al.</i> (2008)
<i>Radix ovata</i> (Draparnaud, 1805)	France	France (Fh)	Dreyfuss <i>et al.</i> (2000)
<i>Radix peregra</i> (Müller, 1774)	Fridrichsdal (Danemark)	Europe Centrale (Fh, Fg)	Bargues et Mas-Coma (2005)
<i>Radix rubiginosa</i> (Michelin, 1831)		Asie de l'est Malaysia (Fg)	Kaset <i>et al.</i> (2010)
<i>Radix subdisjuncta</i> (Nevill, 1878)	Ladak (Inde)	Turkménie (Fg)	Bargues et Mas-Coma (2005)
<i>Radix swinhoei</i> (Adams, 1866)		Sud-Est asiatique Philippines (Fg)	Kaset <i>et al.</i> (2010)
<i>Radix tenera</i> (Küster, 1863)	Perse	Turkménie (Fg)	Bargues et Mas-Coma (2005)
<i>Stagnicola caperata</i> (Say, 1829)	Indiana, Etats Unis	Amérique du Nord (Fh)	Knapp <i>et al.</i> (1992)
<i>Stagnicola corvus</i> (Gmelin, 1791)	Thuringe (Allemagne)	Europe (Fh)	Beran (2008)
<i>Stagnicola fuscus</i> (Pfeiffer, 1821)	Füred, Tihany (Hongrie)	Europe (Fh)	Beran (2008)
<i>Stagnicola palustris</i> (Müller, 1774)	Oregon, Etats Unis	Europe (Fh)	Beran (2008)

### L'Archipel Cubain et la transmission de la fasciolose

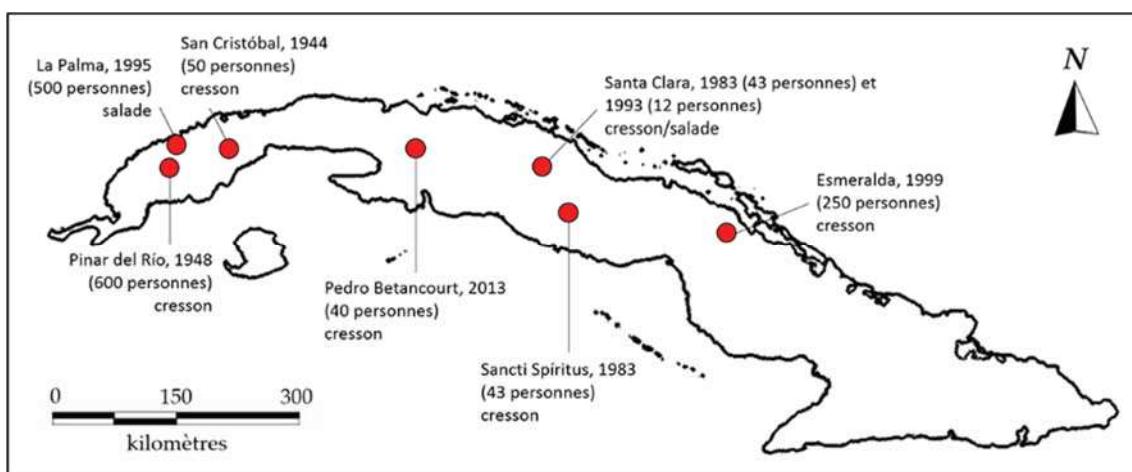
Cuba est un archipel situé à l'entrée du Golfe du Mexique au Sud de la Floride, dans la Mer Caraïbe. L'Archipel Cubain est formé majoritairement par deux îles, Cuba et l'Île de la Jeunesse (antérieurement connue comme l'Île des Pins). S'ajoutent près de 4 000 îlots (figure 4). L'Île de Cuba est une bande de terre longue et étroite d'environ 1 250 km avec 191 km dans la partie la plus large. Sa superficie est de 105 007 km<sup>2</sup> et elle est peuplée de 11 240 000 habitants. Trois formations montagneuses importantes sont présentes au centre et aux extrémités de l'île. Les plaines prédominent avec de vastes surfaces de terres basses facilement inondables à la saison des pluies. Ce type d'environnement offre des habitats très favorables pour les limnées, où elles peuvent maintenir des populations stables pendant toute l'année (Perera, 1996). La température moyenne annuelle de l'air à Cuba est 27°C et l'humidité relative est de 85%. Il y a deux périodes de fortes pluies au cours de l'année : en mai-juin et en septembre-octobre et une période plus sèche entre décembre et mars.



**Figure 4.** Localisation géographique de l'île de Cuba dans la région Caraïbe.

Le parasite *F. hepatica* a été signalé à Cuba au début du XX<sup>e</sup> siècle avec quelques cas humains (Kourí et Arenas, 1931). A la suite des travaux de Kourí (1940), l'étude de cette parasitose et de sa prévalence dans la population humaine et le bétail est abandonnée jusqu'à la fin des années 1990 voire au début des années 2000 (Espino *et al.* 1998 ; Beovides *et al.* 2006; Díaz *et al.* 2011). Pourtant, au moins huit épidémies humaines importantes et plusieurs cas sporadiques ont été enregistrés entre 1944 et 2013 à Cuba (figure 5) (Rojas *et al.* 2010). L'augmentation des cas isolés observés le plus souvent dans

les régions rurales n'est pas négligeable (Díaz *et al.* 2011). Les infections humaines par *F. hepatica* à Cuba ont été traditionnellement associées aux cultures du cresson (*Nasturtium officinale*). Ce type de culture est caractérisé par une inondation des parcelles où les limnées trouvent un habitat favorable pour s'établir (Ferrer *et al.* 1989). La gestion du cresson et des autres cultures à Cuba peut nécessiter l'utilisation de la force animale, particulièrement des bovins. Or, le cycle de vie de *F. hepatica* peut fonctionner parfaitement si les animaux utilisés sont infectés. D'autres formes d'infections humaines ont été rapportées, comme l'utilisation de l'eau contaminée par des métacercaires flottantes (Rojas *et al.* 2010).



**Figure 5.** Localisation des principales épidémies de fasciolose humaine à Cuba avec le nombre de cas et la source d'infection.

En plus des problèmes de santé publique, la fasciolose à Cuba présente des problèmes importants au niveau vétérinaire avec un coût économique associé très élevé (González *et al.* 2007; Brito *et al.* 2010). Les effets les plus notables de cette parasitose pour l'élevage sont les pertes de poids et la mortalité de nombreux animaux, les saisies aux abattoirs, et les coûts excessifs des produits antiparasitaires utilisés par l'État Cubain (Rojas *et al.* 2010). Cette parasitose est très difficile à contrôler à Cuba actuellement car c'est un pays où il y a de grandes difficultés à obtenir les médicaments antiparasitaires et les mollusquicides nécessaires pour combattre les mollusques. Les estimations des pertes économiques dues à la fasciolose au cours des dernières années sont résumées dans le tableau 3.

**Table 3.** Estimations des pertes dues à la fasciolose dans l'élevage entre 2009 et 2013 (IMV, 2013).

Années	Nombre total de foies infectés	Proportion de foies parasités (%)	Masse de foies perdus (kg)
2009	124 430	26,84	390 268
2010	125 921	34,83	362 188
2011	158 794	46,11	468 858
2012	148 565	44,82	509 576
2013	114 851	31,62	561 478
<i>Total</i>	<i>548 131</i>	<i>29,40</i>	<i>2 292 368</i>

La transmission de *F. hepatica* à Cuba est permise par la présence de deux (et uniquement deux) espèces de limnées (*Galba cubensis* et *Pseudosuccinea columella*) décrites depuis longtemps (Aguayo et Jaume, 1947). Les études de malacologie médicale concernant les limnées et la transmission de fasciolose à Cuba se sont plutôt intéressées à l'écologie et à la biologie des limnées cubaines (Perera, 1996) ou à la résistance de certaines populations de *P. columella* à l'infection par *F. hepatica* (Gutiérrez, 2004). De plus, quelques travaux concernant le contrôle de leur populations afin de réduire la transmission sur le terrain ont étudié des alternatives chimiques et biologiques. Dans le premier cas, des mollusquicides obtenus à partir de plantes endémiques (*Agave legrelliana*) ont été testés (Yong et Rodríguez, 1994). Les stratégies de contrôle biologique sur les hôtes de *F. hepatica* à Cuba ont étudié le thiaridae *Tarebia granifera* et le planorbidae *Helisoma duryi* qui ont la capacité de réduire les populations de *Galba cubensis* (Perera et al. 1991 ; 1993). En revanche, les études n'ont jamais intégré les interactions hôtes-parasites en analysant la compatibilité douve/limnée, les prévalences naturelles ni expérimentales, pas plus que la diversité génétique qui permettrait de mieux comprendre la susceptibilité et virulence dans ce système.

## Objectifs de l'étude

Les objectifs généraux de notre étude sont de déterminer et caractériser les principaux facteurs impliqués dans l'interaction entre *F. hepatica* et les deux espèces de limnées présentes à Cuba.

Pour répondre à cet objectif, nous proposons des objectifs spécifiques sur les interactions douves – limnées à Cuba, à savoir :

- *Diversité de douves*
  - Comparer les prévalences naturelles de *F. hepatica* chez les hôtes définitifs (bovins) ;
  - Caractériser la diversité de souches de douves provenant de différentes régions à Cuba.
- *Ecologie et biologie des populations des hôtes intermédiaires*
  - Comparer la distribution et l'écologie des limnées présentes à Cuba ;
  - Déterminer la structure génétique de leurs populations naturelles.
- *Compatibilité douve – limnée*
  - Caractériser les taux d'infections naturelles chez les mollusques dans les aires de transmission de la fasciolose à Cuba ;
  - Déterminer expérimentalement la compatibilité hôte-parasite entre différentes souches de douves et de populations de limnées.

---

## Chapitre 1 : Diversité de la douve du foie (*Fasciola hepatica*) à Cuba

### Article 1 : accepté dans *Journal of Helminthology*

#### **Genetic and infective diversity of the fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) from Cuba**

A.A. Vázquez, M. Louannas, J. Sánchez, A. Alba, A. Milesi and S. Hurtrez-Boussès

### 1.1. Relation diversité génétique – capacité d'infection

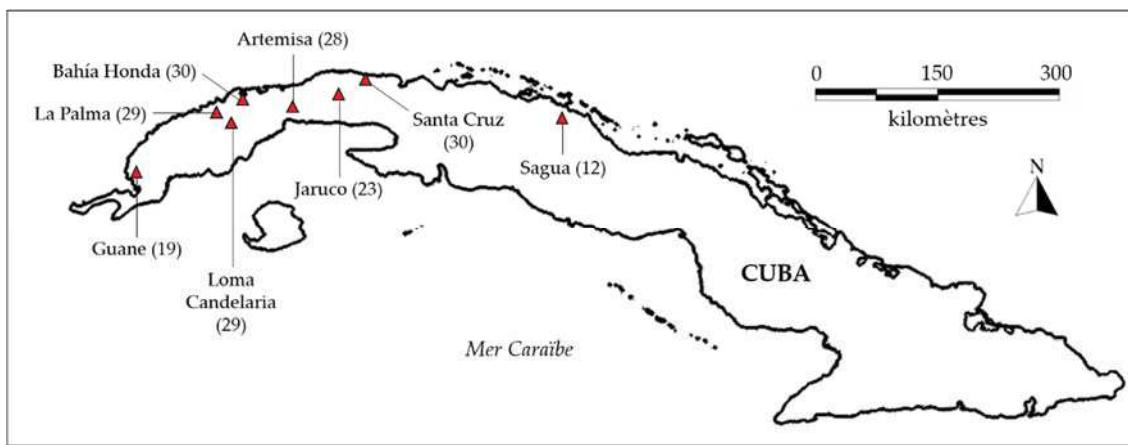
La capacité d'infection d'un parasite est étroitement liée à sa diversité génétique, qui fait qu'il est plus ou moins compatible avec ses hôtes (Dybdahl et Storfer, 2003). *Fasciola hepatica* présente une grande diversité génétique qui suggère une préférence de l'allofécondation pour ce parasite hermaphrodite (Hurtrez-Boussès *et al.* 2004 ; Vilas *et al.* 2012 ; Cwiklinski *et al.* 2015). Les marqueurs microsatellites sont aisément utilisés pour explorer la structure génétique d'une population particulière grâce au large polymorphisme qu'ils présentent (de Meeûs *et al.* 2007). Chez la douve du foie, Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) ont isolé et caractérisé six marqueurs microsatellites très utilisés dans des études de diversité génétique (e.g., Vilas *et al.* 2012). Ici, dans notre étude, on explore la génétique des populations de huit isolats de *F. hepatica* provenant de différentes régions de Cuba pour mieux comprendre la diversité et le fonctionnement de ce parasite. On compare aussi les différents taux d'infection chez les bovins de ces souches dans les abattoirs. Ceci va aider à améliorer la connaissance des interactions hôtes-parasites et pourra contribuer à la mise en place de politiques sur la gestion du bétail en relation avec le flux génétique de douves entre différentes populations.

## 1.2. Matériel et Méthodes

### 1.2.1. Échantillonnage de *F. hepatica* et estimations des taux d'infection aux abattoirs

L'échantillonnage des huit isolats de *F. hepatica* a été fait dans des abattoirs de différentes régions à Cuba entre 2010 – 2012 (voir figure 1.1 pour les localités exactes et tailles d'échantillons). Un isolat est considéré comme le stock de douves échantillonnées dans un même abattoir, à la même date et chez une même espèce hôte. Sept isolats de douves de vaches (Artemisa, Bahía Honda, La Palma, Loma Candelaria, Guane, Santa Cruz et Sagua) et un de buffle (Jaruco) ont été échantillonnés. Les taux d'infection aux abattoirs ont été obtenus par l'inspection systématique des foies des bovins abattus à chaque fois. Pour la localité La Palma, deux échantillonnages ont été réalisés (voir table 1.1 pour les dates).

Les douves adultes récupérées vivantes ont été stockées directement dans l'éthanol (95%). Pour la localité de La Palma, on a gardé seulement les individus collectés en septembre 2010. A cause de contraintes aux abattoirs, il a été impossible d'obtenir les douves d'un hôte de Santa Cruz et de sept hôtes de Jaruco. Pour les autres isolats, on a échantillonné au moins une douve par hôte définitif (voir tableau 1.1 pour les détails). Tous les individus de différents bovins qui appartenaient au même isolat ont été stockés ensemble.



**Figure 1.1 :** Localisation des isolats de *Fasciola hepatica* utilisés (entre parenthèses : tailles d'échantillons de chaque isolat)

### 1.2.2. Extraction d'ADN, amplification de microsatellites et génotypage

Une petite partie du tissu appartenant à la partie postérieure de chaque individu de douve ( $2 \text{ mm}^2$ ) a été utilisé pour l'extraction d'ADN. L'extraction a été faite en utilisant la méthode au Chelex (Estoup et Martin, 1996) adaptée pour des plaques de 96 puits. En bref, le tissu de chaque individu a été séché (élimination de l'alcool) et placé dans un puits contenant  $100 \mu\text{L}$  de Chelex<sup>®</sup>100 (5%) (Bio-Rad Laboratories, Inc.) et  $5 \mu\text{L}$  de protéinase K (10 mg/mL). La plaque a été vortexée et incubée durant une nuit à  $56^\circ\text{C}$ , puis 10 min à  $95^\circ\text{C}$ . Après nouveau vortexage et centrifugation à 6000 xg pendant six minutes, le surnageant contenant l'ADN a été récupéré et conservé au congélateur à  $-20^\circ\text{C}$ .

L'ADN extrait a été dilué de moitié et utilisé pour les amplifications de microsatellites. Quatre loci microsatellites (FH15, FH23, FH25 et FH222CBP; numéros d'accésion Genbank respectifs AJ508371, AJ508372, AJ508373 and AJ003821) ont été amplifiés par PCR conformément aux protocoles décrits par Hurtrez-Boussès *et al.* (2004). Chaque locus a été amplifié en utilisant  $2 \mu\text{L}$  d'ADN dilué dans  $20 \mu\text{L}$  de volume de réaction contenant  $4 \mu\text{L}$  buffer 5x (Promega),  $1,2 \mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> 25mM,  $2 \mu\text{L}$  dNTPs 2mM (Invitro-gen/Life Technology),  $1 \mu\text{L}$  de chaque amorce (10 pmol) et  $0,2 \mu\text{L}$  de *Taq* ADN polymérase 1U (Promega) ( $20 \mu\text{L}$  QSP). Les amorces ont été marquées par fluorescence pour les utiliser dans un séquenceur automatique ABI (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA). Les séquences des amorces sont celles décrites par Hurtrez-Boussès *et al.* (2004). Les amplifications ont été conduites sur thermocycleurs MJ-Research PTC 100 96-puits. Elles ont consisté en 4 min de dénaturation à  $94^\circ\text{C}$ , 31 cycles à température d'hybridation (FH15 =  $48^\circ\text{C}$ , FH23 =  $50^\circ\text{C}$ , FH25 =  $51^\circ\text{C}$ , FH40 =  $50^\circ\text{C}$ ) pendant 30 s, puis 30 s à  $72^\circ\text{C}$ , suivis d'une étape finale d'elongation à  $72^\circ\text{C}$  pendant 10 min. Un microlitre du produit PCR de chaque échantillon a été dilué 1/100. Un mix contenant  $3 \mu\text{L}$  du produit PCR dilué,  $0,25 \mu\text{L}$  de marqueur de taille (GENESCAN 500 LIZ, Applera) et  $15 \mu\text{L}$  Hi-Di Formamide ( $20 \mu\text{L}$  QSP) a été utilisé pour les électrophorèses automatiques au séquenceur. La lecture des tailles des allèles a été faite en utilisant le logiciel GeneMapper<sup>®</sup> v. 4.0 (Applied Biosystems<sup>TM</sup>).

### 1.2.3. Analyses de génétique de populations

Les paramètres courants de génétique de populations tels que le nombre moyen d'allèles ( $a$ ), les estimateurs d'hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et attendue ( $H_e$ ), et le  $F_{IS}$  ont été calculés pour chaque locus. La différenciation par paire de populations ( $F_{ST}$ ) a été aussi calculée. Toutes les estimations ont été faites en utilisant le logiciel FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). La correction de Bonferroni a été utilisée pour les cas de tests multiples (Rice, 1984). Les génotypes multilocus (GTMLs) identiques ont été identifiés et la probabilité d'observer  $n$  copies d'un GTML sous reproduction panmictique (valeur  $P_{sex}$ ) a été testée en utilisant GENECLONE 2.0 (Arnaud-Haond et Belkhir, 2007). Les individus avec des valeurs  $P_{sex}$  statistiquement significatives ( $P_{sex} < 0,05$ ) ont été considérés comme étant le résultat d'une multiplication clonale – infection par des métacercaires issus d'un même miracidium – (Vilas *et al.* 2012). La diversité génotypique a été aussi estimée par l'index adapté de Simpson (Arnaud-Haond et Belkhir, 2007).

## 1.3. Résultats

### 1.3.1. Taux d'infection des bovins aux abattoirs

Les deux espèces de bovins étudiées (vaches et buffles) étaient infectées. Les taux d'infections observés après visites successives aux abattoirs ont varié entre 20% (Guane) et 100% (La Palma et Loma Candelaria). Les prévalences les plus hautes ont été enregistrées dans la région occidentale de Cuba (Pinar del Río), tandis que dans la région du centre-ouest les valeurs variaient entre 60 et 85% (tableau 1.1). Au moment de l'échantillonnage, quelques livraisons de bovins ont été signalées comme traitées avec du Triclabendazole à La Palma (deuxième échantillonnage, décembre 2010). Toutefois, des prévalences de 70% ont été trouvées dans ce lot de bovins traités.

**Tableau 1.1.** Taux d'infection du bétail abattu dans les différentes localités (dont les noms correspondent aux isolats de *Fasciola hepatica*).

T : traité avec Triclabendazole, N : nombre d'hôtes définitifs examinés

Bovin	<i>F. hepatica</i> isolat	Province	N	Bovins infectés (%)	Date	Nombre de douves collectées par hôte
Vaches	Artemisa	Artemisa	30	10 (33,33%)	Sep 2010	2-3
Vaches	Bahía Honda	Pinar del Río	15	14 (93,33%)	Sep 2010	2-3
Vaches	Guane	Pinar del Río	5	1 (20%)	Jan 2011	19
Vaches	La Palma	Pinar del Río	10	10 (100%)	Sep 2010	2-3
Vaches	La Palma (T)	Pinar del Río	20	15 (75%)	Déc 2010	0
Vaches	Loma Candelaria	Pinar del Río	17	17 (100%)	Oct 2010	1-2
Vaches	Santa Cruz	Mayabeque	40	31 (77,55%)	Fev 2011	1*
Vaches	Sagua	Villa Clara	18	11 (61,11%)	Avr 2011	1-2
Buffles	Jaruco	Mayabeque	30	26 (86,66%)	Fev 2012	1*

\*on a seulement pu échantillonner les douves de 30 fois à Santa Cruz et 23 à Jaruco.

### 1.3.2. Structure des populations et diversité génétique

Les quatre loci étudiés sont polymorphes dans chacun des huit isolats. Au total, trente allèles ont été répertoriés parmi tous les isolats et loci étudiés (moyenne des allèles par locus :  $7,5 \pm 3,7$  SD). Le locus FH222CBP est le plus polymorphe avec 12 allèles différents tandis que les locus FH25 est le moins polymorphe (3 allèles). On n'a pas observé de déséquilibre de liaison significatif entre toutes les paires de loci.

Le nombre moyen d'allèles, les hétérozygosités observée et attendue, ainsi que les valeurs de  $F_{IS}$  pour chaque population sont présentés dans le tableau 2.2. Des écarts significatifs à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HW) ont été observés pour les isolats de Bahía Honda, Loma Candelaria et Santa Cruz. En revanche, ces forts écarts n'ont été trouvés que dans le locus FH23 ( $F_{IS} = 1$  ( $p < 0,05$ ), 0,726 ( $p < 0,05$ ) et 1 ( $p < 0,005$ ) respectivement) tandis qu'aucun des autres loci n'a manifesté d'écart significatif à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) qui avaient signalé l'existence d'allèles nuls à ce locus FH23. Pour cette raison, on a décidé de ré-analyser les données sans ce locus (tableau 2.2).

**Table 1.2.** Nombre moyen d'allèles (a), hétérozygoties observée ( $H_o$ ) et attendue ( $H_e$ ),  $F_{IS}$  et valeur de  $P$  après correction de Bonferroni pour chaque isolat étudié.

*en italique : valeurs obtenues sans le locus FH23*

NS = non significatif, SD = écart-type

n = nombre d'individus analysés

Isolat	n	a ( $\pm$ SD)	$H_o$ ( $\pm$ SD)	$H_e$ ( $\pm$ SD)	$F_{IS}$	P
Artemisa	28	3,75 ( $\pm$ 1,26)	0,415 ( $\pm$ 0,309)	0,450 ( $\pm$ 0,233)	0,078	NS
		3,67 ( $\pm$ 1,53)	0,463 ( $\pm$ 0,36)	0,421 ( $\pm$ 0,277)	-0,098	NS
Bahía Honda	30	4,75 ( $\pm$ 2,36)	0,383 ( $\pm$ 0,345)	0,583 ( $\pm$ 0,248)	0,343	0,0030
		5,33 ( $\pm$ 2,52)	0,510 ( $\pm$ 0,285)	0,551 ( $\pm$ 0,294)	0,074	NS
La Palma	29	4,5 ( $\pm$ 1,92)	0,473 ( $\pm$ 0,297)	0,537 ( $\pm$ 0,225)	0,119	NS
		5 ( $\pm$ 2)	0,511 ( $\pm$ 0,352)	0,529 ( $\pm$ 0,275)	0,032	NS
Jaruco	23	4,25 ( $\pm$ 2,22)	0,372 ( $\pm$ 0,334)	0,523 ( $\pm$ 0,24)	0,290	NS
		5 ( $\pm$ 2)	0,496 ( $\pm$ 0,275)	0,475 ( $\pm$ 0,27)	-0,042	NS
Loma Candelaria	29	4,75 ( $\pm$ 1,71)	0,422 ( $\pm$ 0,254)	0,571 ( $\pm$ 0,243)	0,261	0,0050
		5 ( $\pm$ 2)	0,502 ( $\pm$ 0,242)	0,539 ( $\pm$ 0,288)	0,07	NS
Guane	19	5 ( $\pm$ 1,83)	0,496 ( $\pm$ 0,203)	0,605 ( $\pm$ 0,291)	0,181	NS
		4,67 ( $\pm$ 2,08)	0,453 ( $\pm$ 0,225)	0,521 ( $\pm$ 0,291)	0,131	NS
Santa Cruz	30	5,25 ( $\pm$ 2,22)	0,429 ( $\pm$ 0,38)	0,59 ( $\pm$ 0,252)	0,274	0,0009
		5,67 ( $\pm$ 2,52)	0,572 ( $\pm$ 0,308)	0,55 ( $\pm$ 0,293)	-0,039	NS
Sagua	12	4 ( $\pm$ 0,82)	0,513 ( $\pm$ 0,164)	0,625 ( $\pm$ 0,122)	0,178	NS
		4 ( $\pm$ 1)	0,573 ( $\pm$ 0,136)	0,577 ( $\pm$ 0,095)	0,007	NS

On a observé une très faible différenciation entre populations ( $F_{ST} = 0,05$ , NS). Le tableau 1.3 montre les valeurs de  $F_{ST}$  entre tous les paires de populations. Pratiquement aucune paire de populations n'est différenciée, à l'exception de Guane et Artemisa (probabilité ajustée après correction de Bonferroni : 0,034).

**Tableau 1.3.** Valeurs de l'estimation de la différenciation génétique entre les paires d'isolats ( $F_{ST}$ ) isolats : AT: Artemisa, BH: Bahía Honda, LP: La Palma, JA: Jaruco, LC: Loma Candelaria, GU: Guane, SC: Santa Cruz. SA: Sagua.

\*:  $P < 0,05$

	AT	BH	LP	JA	LC	GU	SC	SA
AT	0							
BH	0,03	0						
LP	0,12	0	0					
JA	0,02	0	0	0				
LC	0,14	0,01	0,04	0,06	0			
GU	<b>0,14*</b>	0,02	0,06	0,06	0	0		
SC	0,12	0,02	0,08	0,05	0	0	0	
SA	0,13	0,02	0,05	0,05	0	0	0,05	0

A cause de l'existence d'allèles nuls, le locus FH23 a été exclu du recensement des GTMLs. Avec les loci restants (FH15, FH25, FH222CBP) on a trouvé 83 GTMLs. La moyenne de GTMLs par isolat est de 13,66 mais on a trouvé une relation étroite avec la taille d'échantillon (corrélation de Spearman  $R = 0,781$  ;  $P = 0,012$ ). Les noms et nombres de GTMLs de chaque isolat, l'index de diversité de Simpson adapté aux GTMLs et les valeurs  $P_{sex}$  statistiquement significatives sont présentés dans le tableau 1.4. La diversité génotypique est élevée pour chacun des isolats. La valeur la plus basse est 0,861 à Artemisa. On a trouvé 23 MLGTs répétés entre les isolats tandis que 60 ont été observés seulement dans des isolats particuliers. Uniquement deux isolats (Artemisa et Santa Cruz) ont montré GTMLs répétés ayant de valeurs  $P_{sex} < 0,05$ .

**Tableau 1.4.** Nombre d'individus (N) avec tous les loci amplifiés, nombre de génotypes multilocus (GTMLs), diversité génotypique (D) et GTMLs avec valeurs de  $P_{\text{sex}} < 0,05$  observées à chaque isolat de *Fasciola hepatica*.

<i>F. hepatica</i> isolat	N	D	Nom du GTMLs (nombre de répétitions)	GTMLs avec $P_{\text{sex}} < 0,05$ (n)
Artemisa	23	0,861	AC, AJ (8), BF, BG (3), BH (3), BO, BP, D, H, I, N, U	BG (1), BH (1)
Bahía Honda	19	0,994	AC, AJ, AM, AX, AZ, B, BC, BE, BJ, BM, BR, CA, CB, CC, F, V (2), W, Y	
La Palma	9	0,972	AF (2), AR, AS, AW, BQ, BX, G, V	
Jaruco	26	0,978	A, AD, AF, AG, AH, AI, AJ (2), AK, AU (2), AW (3), AX, BK, BV, BW, J, V, W, Z	
Loma Candelaria	23	0,992	AA, AE, AF, AJ (2), AO, AW, B, BA, BD, BG, BH, BN, BZ, CE, D, K, P, T, U, V (2), W	
Guane	15	1,000	A, AC, AG, AH, AJ, AN, AQ, AV, AW, AX, BU, CF, R, S, T	
Santa Cruz	24	0,956	AC (4), AJ (2), AL, AP (2), AT, AU (3), AX, AY, BB, BI, BL, L, M, O, P (2), Q	AC (1), AT (1)
Sagua	11	1,000	A, AB, AP, BS, BW, BY, C, CD, E, R, X	

## 1.4. Discussion

### 1.4.1. Prévalences naturelles de *F. hepatica* chez les bovins à Cuba

On a bien noté que le parasitisme par *F. hepatica* dans les populations des bovins à Cuba est intense et persistant, même si les taux d'infection varient entre localités. Nous avons trouvé des individus infectés dans tous les lots d'animaux abattus. La plupart des prévalences sont très élevées (>60%, sauf pour Guane et Artemisa). Les petites différences observées dans les taux d'infection peuvent être expliquées soit par des différences locales dans la transmission (par exemple risque d'accéder à des sites contaminés, densités de mollusques vecteurs etc.), soit par des différences de compatibilité/susceptibilité/infectivité dans le système bovin-douve. De plus, l'âge de l'hôte définitif peut jouer un rôle important si le foyer de contamination est persistant (les hôtes âgés doivent avoir une probabilité supérieure d'être infestés).

#### 1.4.2. Infection de vaches versus buffles

Les espèces d'hôtes différentes peuvent être plus ou moins compatibles avec les différents isolats. Au contraire, nos résultats montrent que les prévalences de buffles sont similaires à celles de vaches. De plus, les valeurs  $F_{ST}$  entre l'isolat de buffle (Jaruco) et celles de vaches ne sont pas significatives. Ce fait suggère que le brassage génétique est très commun entre les isolats de douves présents à Cuba. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) qui n'ont pas trouvé différenciation génétique significative entre les douves infectant bovins, ovins et porcins.

#### 1.4.3. Effets des traitements

Il est également intéressant d'avoir observé quelques bovins traités avec du Triclabendazole (TCBZ) qui est le médicament de choix contre la fasciolose (Fried et Abruzzi, 2010). Etonnamment, les taux d'infection sont élevés (75%) chez ces animaux traités. Ceci suggère que quelques infrapopulations de douves (c'est-à-dire les douves existant dans un individu hôte) évitent l'effet du TCBZ probablement par une résistance. Nonobstant, on n'a pas trouvé de différences génétiques entre la zone traitée et les zones non-traitées. Une réduction de la diversité allélique devrait être mise en évidence chez les zones traitées à cause de forts goulets d'étranglement qui ne sont pas observés ici. Ceci dit, il n'est pas impossible que des traitements aient aussi été appliqués dans d'autres zones sans que nous ayons été mis au courant lors de l'abattage. Il n'en reste pas moins que la politique de contrôle par traitement au TCBZ ne semble pas efficace.

#### 1.4.4. Diversité génétique de *F. hepatica* à Cuba

Le nombre d'allèles trouvés chez les huit isolats de *F. hepatica* à Cuba révèle une très haute diversité génétique. En revanche, il est intéressant de noter que l'isolat avec la plus faible diversité allélique (Artemisa, moyenne d'allèles : 3,67) présente aussi la plus faible prévalence chez les hôtes définitifs.

La grande douve du foie est connue pour pouvoir « choisir » entre autofécondation et l'allofécondation en fonction du nombre des douves dans un foie (Hanna *et al.* 2008). En revanche, l'absence d'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg indique une prédominance de l'allofécondation (Hurtrez-Boussès *et al.* 2004 ; Cwiklinski *et al.* 2015). Quand cette stratégie de reproduction est associée à un flux génétique important (par

exemple le mouvement de bétail infecté dans et entre provinces à Cuba), cela se traduit par une grande population très diversifiée et sans différenciations entre sous-populations. La diversité génétique dans ce cas peut permettre au parasite de s'adapter à différentes populations locales d'hôtes intermédiaires et définitifs (Gandon *et al.* 1996 ; Schulte *et al.* 2013). De plus, la probabilité de trouver dans une population très diversifiée des individus résistants aux drogues antihelminthiques (comme le TCBZ) est élevée.

Les résultats concernant la richesse allélique sont en accord avec ceux observés par Vilas *et al.* (2012), bien que les valeurs trouvées dans notre étude soient légèrement supérieures. En revanche, l'hétérozygotie observée sur l'Altiplano Bolivien par Hurtrez-Boussès *et al.* (2004), en utilisant les mêmes marqueurs microsatellites, était plus faible que celle trouvée ici pour les douves cubaines. Récemment, un nouveau jeu de microsatellites a été développé chez *F. hepatica* et testé sur des populations du Royaume Uni (Cwiklinski *et al.* 2015). Les résultats de leur étude ont montré des valeurs d'hétérozygotie observée et de diversité allélique supérieures à celles notre étude pour presque tous les loci explorés.

La faible valeur du coefficient de différenciation génétique ( $G_{ST}$ ) observée indique que seulement 4% des différences génétiques détectées sont expliquées par les différences entre les populations. Les seules valeurs de  $F_{ST}$  significatives entre les isolats de Guane et Artemisa pourraient être le résultat d'un isolement maintenu entre ces souches. Si on comprend que Cuba est une île étroite et que l'importation de bétail provenant d'autres régions du monde est très limitée, les facteurs géographiques et la gestion des bovins (transport d'animaux entre les différentes régions) peuvent être des facteurs expliquant l'absence de différenciation entre localités. Malheureusement, on n'a pas pu échantillonner les douves de la région orientale à Cuba mais des futures études incluant ces souches pourront contribuer à mieux décrire la transmission à l'échelle totale du pays.

Le nombre de GTMLs observés parmi les huit isolats étudiés est similaire à ceux observés par Vilas *et al.* (2012) en considérant la taille d'échantillonnage. Ces auteurs ont détecté des copies multiples de GTMLs surtout chez les ovins, et en proportion moindre chez les bovins. En revanche, malgré le fait que notre étude ait exploré

uniquement les douves chez les bovins, on n'a trouvé que deux isolats avec deux individus qui peuvent être considérés comme le résultat de la reproduction clonale. Ce résultat renforce l'idée d'une reproduction sexuée très commune chez la douve du foie à Cuba et suggère l'existence de multiples sources de contamination.

Nos résultats suggèrent une relation très étroite entre la diversité génétique de *F. hepatica* et les activités de gestion du bétail à Cuba, bétail qui est fortement infesté. La compréhension de l'effet de la variabilité génétique et de l'adaptation hôte-parasite au niveau des hôtes intermédiaires et définitifs est cruciale pour la prévention et le contrôle de la fasciolose. La diversité génétique mise ici en évidence doit être mise en regard des variations de compatibilité douve/mollusques, point qui sera appréhendé dans le chapitre 3.



---

## Chapitre 2 : Ecologie et biologie des mollusques lymnéidés à Cuba

### 2.1 La famille Lymnaeidae à Cuba : une communauté appauvrie

Les espèces de la famille des Lymnaeidae sont caractérisées par une diversité conchyliologique très élevée et en même temps une plasticité éco-phénotypique qui empêche une distinction claire entre les espèces (Correa *et al.* 2010, 2011). De plus, leur anatomie est extrêmement homogène (Pointier *et al.* 2009) ce qui limite les possibilités d'identification sur des critères morpho-anatomiques (Correa *et al.* 2011).

La diversité mondiale estimée de la famille est d'environ une centaine d'espèces (Järne *et al.* 2010). En revanche, actuellement 60 espèces sont recensées seulement pour la région de l'Amérique du Nord (Johnson *et al.* 2013). Cette diversité est sans doute largement sur-estimée, à cause d'un grand nombre de synonymies.

A Cuba, la situation est beaucoup plus simple, puisque la famille des Lymnaeidae y est représentée seulement par deux espèces (Pointier *et al.* 2005) : *Galba cubensis* Pfeiffer, 1839 et *Pseudosuccinea columella* Say, 1817. En effet, tandis que la faune malacologique à Cuba est très riche et diversifiée pour ce qui concerne les espèces marines et terrestres, ce qui a fait considérer Cuba comme le *Paradis des Malacologistes* par Henry A. Pilsbry (Espinosa et Ortea, 2009), les mollusques d'eau douce ne suivent pas le même pattern et sont faiblement représentés. Cette faible diversité en espèces peut être expliquée par la théorie de MacArthur et Wilson (1967) : l'équilibre du nombre d'espèces dans une île dépend de la distance au continent et de l'aire de l'île. Ces deux facteurs affectent directement les taux d'extinction et colonisation. La condition d'insularité à Cuba réduit donc le nombre d'espèces à Cuba par rapport à l'Amérique du Nord. Les espèces de mollusques dulçaquicoles représentent 1,37 % de toutes les espèces de mollusques à Cuba (1319 espèces terrestres, 1770 marines et 43 d'eau douce) et les limnées 4,65 % des espèces d'eau douce. Un pattern similaire de richesse pour les limnées se retrouve dans le reste des îles des Caraïbes avec une ou deux espèces par île (Pointier, 2008). En revanche, les Lymnaeidae sont plus diversifiés en Amérique du Sud ; par exemple, seulement pour le genre *Galba*, cinq espèces sont présentes

(Correa *et al.* 2010) et on peut trouver jusqu'à trois espèces de ce genre dans une même communauté (Alda *et al.*, en prép : article No. 2).

### **Article 2 : soumis à *Veterinary Parasitology***

#### **Unveiling snail hosts of fasciolosis: a multiplex PCR for the simultaneous identification of three cryptic *Galba* species and its application in communities from North and South America**

P. Alda, M. Lounnas, A.A. Vázquez, A. Gutiérrez, N. Uribe, A. Orlando-Nárvaez, J. Muzzio-Aroca, L. Martini, M. Celi-Erazo, O. Ayaqui, J. Arenas, F.C. Muñiz, E.S. Loker, O. Noya, L. Prepelitchi, C. Wisnivesky-Colli, P. David, J.-P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès

Les deux espèces de limnées cubaines ont fait l'objet de quelques révisions taxinomiques depuis leurs descriptions respectives et quelques synonymies ont été utilisées (tableau 2.1). Cependant, les études récentes de phylogénie moléculaire sur les limnées hôtes de fasciolose mettent au clair la nomenclature des deux espèces (Correa *et al.* 2010).

**Tableau 2.1.** Synonymies utilisées pour les deux espèces de limnées cubaines.

Espèce	Synonymes	Référence
<i>Galba cubensis</i>	<i>Lymnaea cubensis</i>	Pfeiffer, 1839
	<i>Bakerilymnaea cubensis</i>	Burch, 1982
	<i>Fossaria cubensis</i>	Pointier <i>et al.</i> 2005
<i>Pseudosuccinea columella</i>	<i>Lymnaea francisca</i>	Poey, 1858
	<i>Lymnaea columella</i>	Paraense, 1983

Etudier la fasciolose à Cuba nécessite de s'intéresser à ces deux espèces de mollusques car aussi bien *G. cubensis* que *P. columella* ont montré expérimentalement une susceptibilité élevée vis-à-vis de souches cubaines de *F. hepatica* (Gutiérrez *et al.* 2003).

##### **2.1.1 Galba cubensis Pfeiffer 1839**

L'espèce *G. cubensis* a été décrite de Cuba (localité type, donnée sans plus de précision) sous le nom de *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839, et caractérisée comme très commune dans les rivières et lacs de Cuba (Aguayo et Jaume, 1947). La coquille est de

couleur brune uniforme avec une ouverture semi-circulaire. Les adultes peuvent atteindre 10,5 mm de longueur. Cette espèce est très amphibie et on peut la trouver près de l'eau, sur la végétation ou la boue humide (figure 2.1). Dans quelques endroits comme les canaux d'irrigation, les individus peuvent être observés complètement immersés. L'eau est toujours nécessaire pour pondre les œufs et maintenir l'humidité requise pour le développement et l'éclosion.



**Figure 2.1.** *Galba cubensis*. A : coquille, B : individu sur la fange, C : population de *G. cubensis* dans un endroit humide. Trait noir = 5 mm.

Des études sur les traits d'histoire de vie de *G. cubensis* dans des conditions de laboratoire ont montré que les individus peuvent survivre six mois, et que le pic de reproduction a lieu vers l'âge de sept semaines (Gutiérrez *et al.* 2000).

Cette espèce a été trouvée infectée par *F. hepatica* sur le terrain plusieurs fois (voir les taux d'infection dans la section 3.1). De plus, *G. cubensis* a été la seule espèce décrite dans les sites de transmission de fasciolose après des épidémies (Ferrer *et al.* 1985, 1989).

#### 2.1.2 *Pseudosuccinea columella* Say, 1817

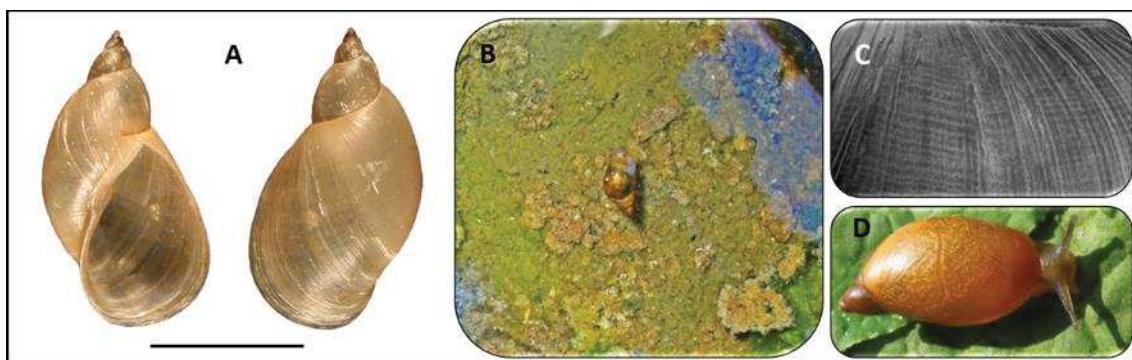
##### Article 3 : *Journal of Helminthology* (2011) 85: 109-111

##### First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean

A. Gutiérrez, A.A. Vázquez, Y. Hevia, J. Sanchez, A.C. Correa, S. Hurtrez-Boussès, J.-P. Pointier and A. Théron

Parallèlement, l'espèce *P. columella* a été décrite à Cuba comme *Lymnaea (Pseudosuccinea) francisca* Poey, 1858, dans la localité de Potrero Omoa à Güines

(localité type). Cette espèce a été trouvée aussi à Pinar del Río, La Habana et Matanzas (Aguayo et Jaume, 1947). Postérieurement, *L. francisca* a été considérée comme un synonyme de *P. columella* (Paraense, 1983). La coquille de cette espèce est brune avec un très long dernier tour de spire et une spire courte. Le périostracum a des sculptures spirales très caractéristiques qui évitent toute confusion avec les espèces terrestres du genre *Succinea* (figure 2.2). Les individus de *P. columella* peuvent atteindre environ 20 mm de longueur. Cette espèce, à la différence de *G. cubensis*, est très aquatique et on la trouve rarement hors de l'eau.



**Figure 2.2.** *Pseudosuccinea columella*. A : coquille, B : individu dans l'eau, C : rides axiales sur le périostracum de *P. columella*, D : espèce terrestre *Succinea uva*. Trait noir = 5 mm.

Dans des conditions de laboratoire, *P. columella* peut vivre jusqu'à six mois (comme *G. cubensis*) mais le pic reproductif apparaît vers la cinquième semaine (Gutiérrez *et al.* 2001).

L'espèce *P. columella* a été trouvée infectée à Cuba pour la première fois dans la localité El Pilón, Pinar del Río en 2010. Cette localité est une rizière, dans laquelle les bovins sont utilisés pour les travaux agricoles. Les densités de limnées y sont très élevées. On a observé une prévalence en *F. hepatica* de 3% chez les *P. columella* de cette zone (Gutiérrez *et al.* 2011).

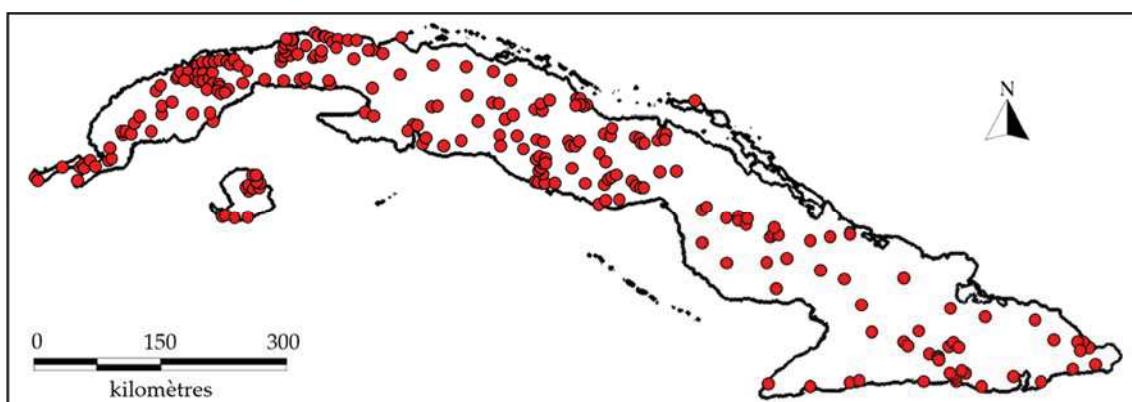
Parallèlement, des populations résistantes à l'infection expérimentale par *F. hepatica* ont été décrites pour cette espèce à Cuba (Gutiérrez *et al.* 2003).

## 2.2 Distribution et préférences d'habitats des limnées à Cuba

La distribution historique des limnées cubaines a été rapportée par diverses études à la fin des années 1990 (Perera, 1996 ; Yong, 1998). En revanche, ces études se sont appuyées sur la compilation de données accumulées pendant les trente dernières années. Une étude pour recenser toutes les localités reste donc nécessaire pour actualiser la distribution de ces espèces par région. De plus, la connaissance des préférences d'habitats pour chacune des espèces est indispensable pour comprendre la transmission de fasciolose. Avant de s'intéresser à la stratégie de contrôle dans une épidémie de fasciolose, il faut une connaissance précise de la localisation des populations à contrôler. Il est bien connu que les limnées sont capables de s'établir dans plusieurs écosystèmes, mais comprendre les patterns de distribution et l'association avec un type d'habitat spécifique reste essentiel pour minimiser les efforts.

### 2.2.1 Matériel et Méthodes

On a échantillonné 370 localités sur l'ensemble de l'archipel pour recenser les limnées (figure 2.3). Les cartes de distribution ont été réalisées en utilisant le Système d'Information Géographique MapInfo v11.0 (Pitney Bowes Software Inc., 2011) à partir de données précises de longitude et latitude obtenues par un GPS (Garmin) dans chaque localité.



**Figure 2.3.** Localités échantillonnés à Cuba (cercles rouges).

Chaque type d'habitat a été identifié en accord avec la clé de la Convention RAMSAR pour les zones humides (RAMSAR, 2006). Tous les habitats ont été caractérisés en fonction de leur degré d'anthropisation (peu transformés ou très transformés) (tableau 2.2).

Les comparaisons entre les deux groupes pour chaque espèce ont été testées par un test non-paramétrique U (Mann-Whitney), en utilisant le logiciel Statistica v8.0 (StatSoft, Inc., 2008). Toutes les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à partir d'une valeur de  $P < 0,05$ .

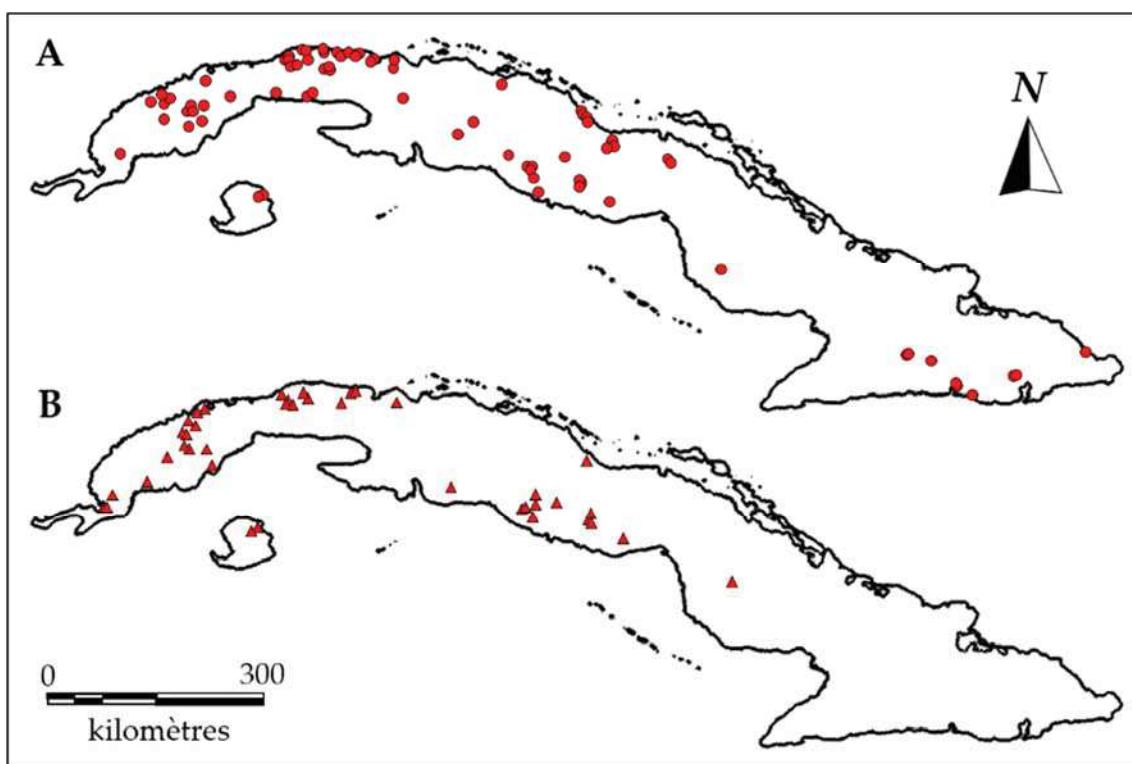
**Tableau 2.2.** Typologie de chaque écosystème en fonction du degré d'anthropisation.

Type d'habitat	Degré d'anthropisation
Ruisseau	
Savane inondable	
Source	Peu transformé
Rivière	
Mare temporaire	
Mare permanente	
Lac artificiel	
Champs agricoles inondés	
Canal	Très transformé
Etang artificiel	
Lagune d'épuration	
Fossé collecteur d'effluents	

## 2.2.2. Résultats

### 2.2.2.1 Distribution des limnées à Cuba

Les cartes de distribution des deux espèces (figure 2.4) montrent que *G. cubensis* est très répandue sur l'ensemble de l'île de Cuba tandis que *P. columella* occupe la partie occidentale, jusqu'à la province de Camagüey, dans le Centre-Est. Le nombre de populations par région est variable avec une représentation moindre dans la partie orientale.



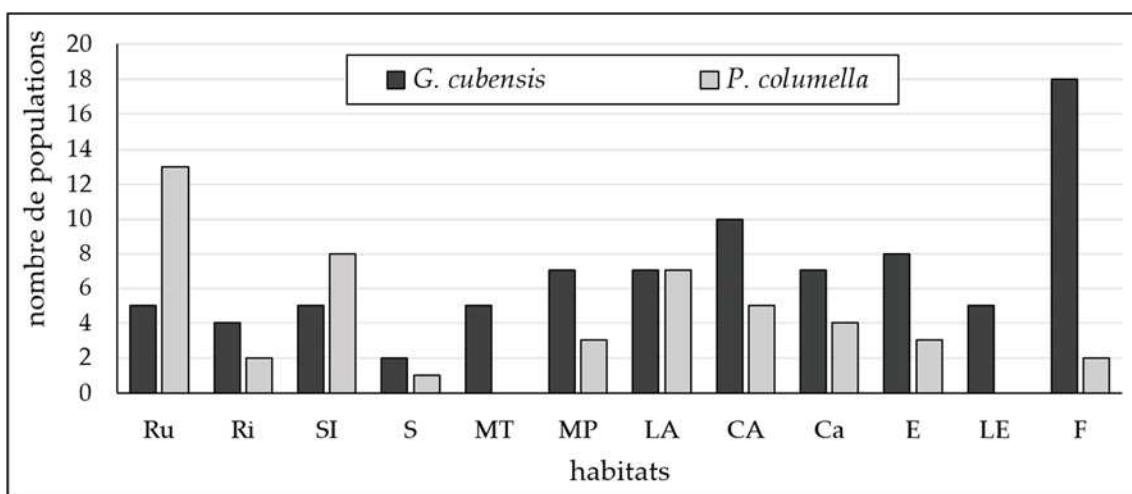
**Figure 2.4.** Distribution des limnées cubaines. A = *Galba cubensis*, B = *Pseudosuccinea columella*.

#### 2.2.2.2 Préférence d'habitats par espèce de limnée à Cuba

Sur la figure 2.5 sont présentés les habitats les plus courants où se trouvent normalement les populations de limnées à Cuba. L'espèce *G. cubensis* est prédominante dans les endroits les plus fortement anthropisés voire pollués, alors que *P. columella* se trouve de manière égale dans des habitats naturels et anthropisés (figure 2.6). Le nombre de populations diffère significativement entre les types d'habitats (peu transformé et très transformé) pour *G. cubensis* ( $P = 0,024$ ), mais pas pour *P. columella* ( $P = 0,8$ ).



**Figure 2.5.** Ecosystèmes typiques pour les limnées à Cuba. A = ruisseau (V122, Pinar del Río) ; B = rivière (Río Negro, Sancti Spíritus) ; C = lac artificiel (Hanabanilla, Villa Clara) ; D = cressonnière (Batabanó, Artemisa) ; E = rizière (Pilón, Pinar del Río) ; F = mare permanente (IPA, Pinar del Río) ; G = savane inondable (La Coca, La Habana) ; H = mare temporaire (V505, Artemisa) ; I = microhabitat avec une population de limnées (*Galba cubensis*) à La Havane.



**Figure 2.6.** Nombre de populations échantillonées par type d’habitat chez les deux espèces de limnées à Cuba (*Galba cubensis* et *Pseudosuccinea columella*). Ru = ruisseau ; Ri = rivière ; TI = terrain inondé ; S = source ; MT = mare temporaire ; MP = mare permanente ; LA = lac artificiel ; CA = champ agricole inondé ; CI = canal d’irrigation ; EA = étang artificiel ; LO = lagune d’épuration ; F = fossé collecteur d’effluents.

### 2.2.3. Discussion

Le pattern de distribution observé chez les deux espèces met en évidence une plus large tolérance de *G. cubensis* aux conditions écologiques à Cuba. Ce fait est probablement dû à l’histoire évolutive de cette espèce dans l’archipel. L’espèce *G. cubensis* a été décrite à Cuba par Pfeiffer (1835) comme très commune, ce qui suppose qu’elle était établie dans l’archipel depuis longtemps. L’invasion de *P. columella* à Cuba est probablement plus récente. Cette espèce est probablement originaire de l’Amérique du Nord (Baker, 1925) et peut avoir été introduite à Cuba par exemple par des oiseaux aquatiques ou par l’activité humaine. Cette espèce est très répandue par le monde à cause de son introduction par le commerce des plantes aquatiques et est considérée comme exotique (Pointier *et al.* 2009 ; Lounnas *et al.*, soumis : article No. 7).

Le fait qu’on trouve *G. cubensis* couramment dans des endroits moins naturels et plus affectés par les activités humaines, ainsi que son pattern de distribution couplé à son comportement amphibie augmentent la probabilité de s’infecter et transmettre la douve du foie.

## 2.3 Ecologie des limnées

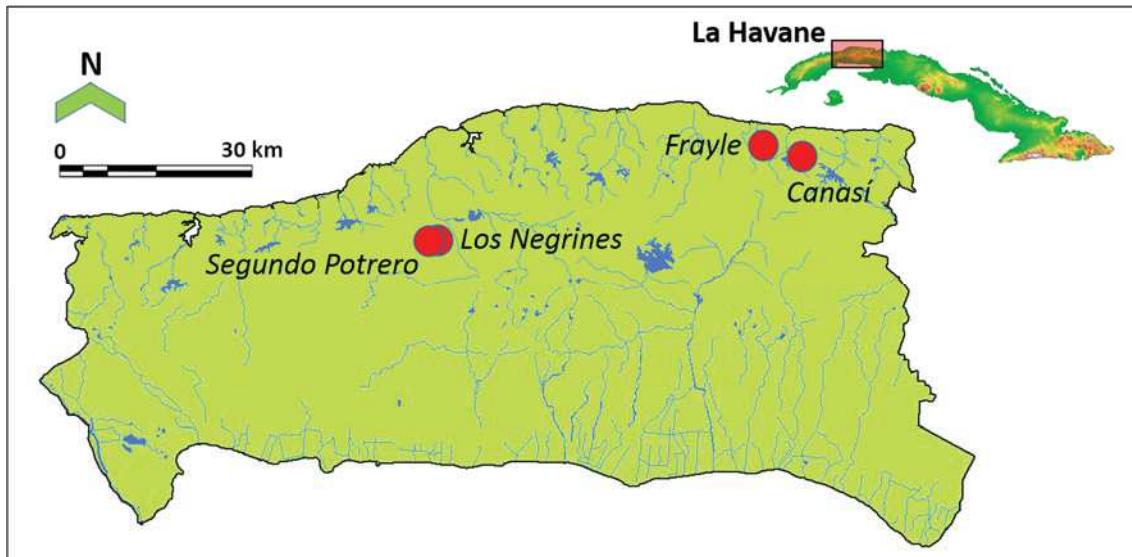
Les études écologiques des populations de mollusques d'intérêt médical et vétérinaire sont essentielles pour comprendre leur rôle dans la transmission des maladies. Dans certains cas, il est nécessaire d'avoir une connaissance quantitative de la composition d'une communauté dans un endroit particulier ou au cours du temps. Dans le cas d'assemblages de mollusques d'eau douce, la diversité est fortement affectée par les changements de la végétation aquatique et les facteurs physico-chimiques de l'eau (Perera, 1996), ainsi que les relations interspécifiques comme la compétition ou le parasitisme (Dillon, 2000).

L'écologie des limnées est donc particulièrement intéressante pour suivre la transmission de *F. hepatica*. Des études ont montré que la stabilité des populations et la forte abondance des limnées sont directement proportionnelles à un très fort taux d'infection par *F. hepatica* chez les bovins (Prepelitchi *et al.* 2011). Par ailleurs, quelques espèces de plantes (notamment *Juncus spp.*) peuvent être considérées comme de bonnes indicatrices de présence de *G. truncatula* (hôte prépondérant de *F. hepatica* en France) (Rondelaud *et al.* 2011). Cependant, les études sur l'écologie des limnées dans les conditions naturelles ne sont pas très nombreuses par rapport à celles sur les planorbidés vecteurs de schistosomiase ou quelques thiariidés qui jouent un rôle dans la lutte biologique (Pointier et Jourdane, 2000 ; Pointier *et al.* 2005). A Cuba, le travail le plus complet sur l'écologie des mollusques d'eau douce a été mené par Perera (1996), en analysant les variations de l'abondance à différentes échelles temporelles et spatiales. Une étude réalisée par Gutiérrez (2004), plus centrée sur la relation entre les limnées cubaines et quelques facteurs du milieu, a considéré deux localités à Pinar del Río et a mis en évidence quelques corrélations positives intéressantes entre la température et les nitrites avec *P. columella* et la dureté avec *G. cubensis*.

Des études sur la dynamique des populations des deux espèces dans la nature restent à faire. Il est surtout important de tester les corrélations entre les abondances de mollusques et les facteurs écologiques dans différents sites. De plus, l'évaluation écologique de populations résistantes de *P. columella* est très intéressante pour comprendre leur maintien et leur fonctionnement dans des régions de fasciolose. Notre étude a donc comme objectif compléter ces travaux en étudiant plusieurs localités à Cuba.

### 2.3.1 Matériel et Méthodes

Deux localités dans la région de la Havane ont été régulièrement échantillonnées pour étudier la dynamique des populations de mollusques d'eau douce (figure 2.7).



**Figure 2.7.** Sites échantillonnés dans la province de La Havane pour étudier la dynamique de populations de limnées.

#### 2.3.1.1 Localité de Jibacoa

Cette localité est située dans la région Nord-Est de la Havane, dans une zone rurale. Deux sites y ont été sélectionnés pour étudier la dynamique des populations de limnées : Canasí ( $23,13044^{\circ}\text{N}$  ;  $81,79094^{\circ}\text{O}$ ) et Frayle ( $23,1475^{\circ}\text{N}$  ;  $81,8807^{\circ}\text{O}$ ). Canasí n'a été pas signalé comme foyer de fasciolose. L'habitat est une mare temporaire peu profonde avec quelques plantes aquatiques parmi lesquelles *Cabomba furcata* est prédominante. La végétation du bord correspond est constituée de graminées. Le site est éloigné des zones habitées et les perturbations humaines peuvent être considérées comme nulles. Frayle se trouve près de la mer, à 7 km de Canasí et l'endroit est considéré comme une zone de fasciolose animale. Le site est couvert par de la végétation herbacée, en majorité des graminées. La plupart du site est inondé et quelques bâtiments destinés à l'élevage des bovins se trouvent à proximité. Le sol est boueux et très humide presque toute l'année ; les excréments de bovins y sont abondants. Ce site est habité en permanence par les personnes employées à l'élevage qui modifient constamment l'habitat des limnées. Les deux sites ont été échantillonnés une fois par mois pendant une année (2011).

### 2.3.1.2 Localité de La Coca

La localité de La Coca se trouve à l'Ouest de la Havane, dans une région endémique de fasciolose. La région est une grande aire de terrains bas normalement inondés pendant la saison des pluies ; elle est destinée à l'élevage des bovins. Toute la zone est traversée par des canaux d'irrigation qui sont en même temps utilisés pour abreuver le bétail. La plupart de la végétation est constituée de graminées mais dans les canaux on peut trouver quelques plantes aquatiques comme *Typha dominguensis* et *Eichhornia crassipes*. Deux sites d'échantillonnage de mollusques ont été sélectionnés en considérant les populations de *P. columella*. Le premier site est appelé Los Negrines ( $22,95687^{\circ}\text{N}$  ;  $82,46496^{\circ}\text{O}$ ), avec une population de *P. columella* susceptible à l'infection par *F. hepatica*. Le deuxième site s'appelle Segundo Potrero ( $22,95541^{\circ}\text{N}$  ;  $82,45982^{\circ}\text{O}$ ) et se trouve à 700 m à l'Ouest de Los Negrines. Une population de *P. columella* résistante à *F. hepatica* est établie dans ce site. Les deux sites ont été échantillonnés une fois par mois pendant deux années (2011-2012).

### 2.3.1.3 Echantillonnage et variables mesurées

Pour chaque localité, on a estimé l'abondance relative de chaque espèce en comptant le nombre de mollusques échantillonnés pendant 15 minutes (Perera, 1996) à l'aide d'une passoire de maille de 1 mm et de pinces. L'échantillonnage a été fait toujours par la même personne (AA Vázquez) entre 9h et 10h. Tous les mollusques collectés ont été stockés directement dans de l'éthanol 80%, puis comptés et identifiés au laboratoire. L'identification des espèces a été faite d'après Pointier *et al.* (2005).

Les variables environnementales ont été séparées en facteurs abiotiques et biotiques. La dureté totale et en carbonates ( $\text{d}^{\circ}$ ), la température ( $^{\circ}\text{C}$ ), la concentration en nitrites (mg/mL) et en phosphates (mg/mL), la concentration en oxygène (%), la salinité (ppm) et le pH ont été mesurés en utilisant un kit d'analyse de l'eau (Merck). La végétation aquatique a été appréciée par un indice de recouvrement selon les critères suivants : 5=  $>75\%$  ; 4= entre 50 et 75% ; 3= entre 25 et 50% ; 2= entre 5 et 25% ; 1=  $<5\%$ . Deux indices écologiques ont été calculés sur la base de l'abondance de chaque espèce de mollusque par localité. L'indice de diversité de Simpson (D) :

$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^S p_i^2}$ , où  $p_i$  correspond à la proportion de l'espèce  $i$  et  $S$  au nombre d'espèces dans l'assemblage (Simpson, 1949) ;

et la régularité entre les espèces ou la probabilité de rencontre interspécifique (PRI) :

$PRI = \left( \frac{N}{N - 1} \right) \left( 1 - \sum_{i=1}^S \left( \frac{n_i}{N} \right)^2 \right)$ , où  $N$  correspond au nombre d'individus de toutes les espèces et  $n_i$  au nombre d'individus de l'espèce  $i$  (Hurlbert, 1972).

Afin de déterminer les associations pouvant exister entre l'abondance des mollusques et les variables environnementales, des analyses canoniques des correspondances ont été effectuées (Ter-Braak et Verdonschot, 1995). Ce type d'analyse permet de détecter les relations unimodales entre les distributions des espèces et les variables externes.

Une courbe de rang/abondance qui permet de comparer les changements d'espèces rares et dominantes a été tracée dans quelques sites. Ce type d'analyse est utilisé pour compléter les indices écologiques et visualiser les relations entre les espèces (Magurran et McGill, 2010).

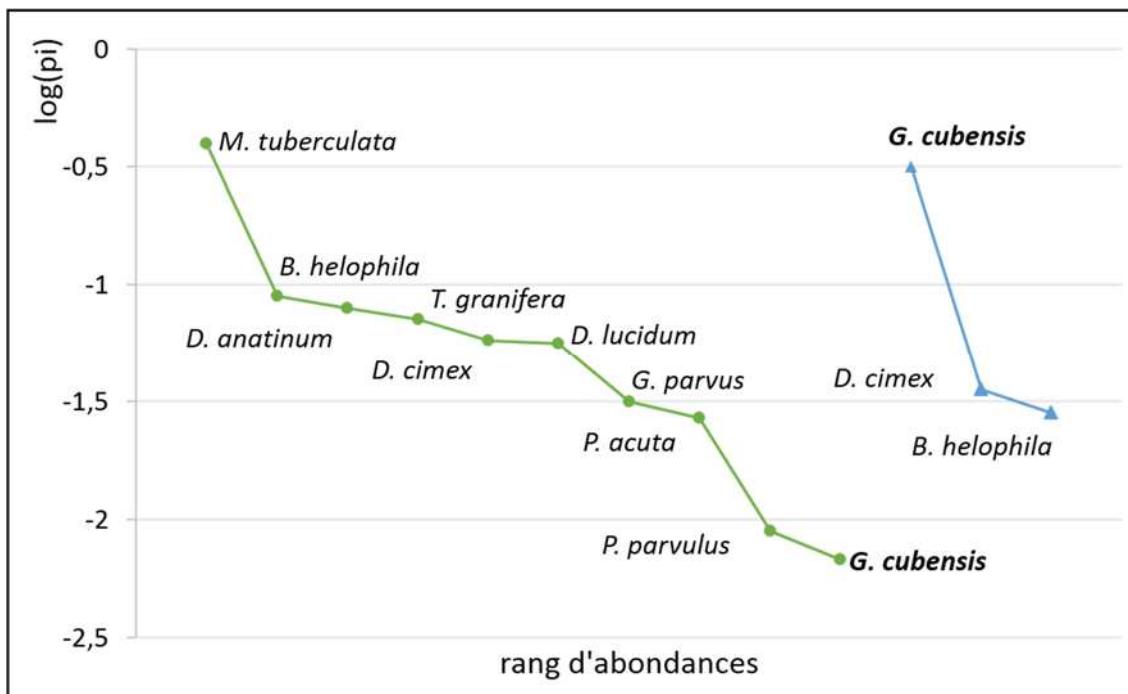
### 2.3.2 Résultats

#### 2.3.2.1 Localité de Jibacoa

L'espèce *G. cubensis* a été la seule limnée trouvée à Jibacoa dans les deux sites. Outre cette espèce, les mollusques d'eau douce trouvés sont *Melanoides tuberculata* et *Tarebia granifera* (Thiaridae), *Pyrgophorus parvulus* (Hydrobiidae), *Physa acuta* (Physidae) et *Biomphalaria helophila*, *Drepanotrema anatinum*, *Drepanotrema lucidum*, *Drepanotrema cimex* et *Gyraulus parvus* (Planorbidae).

L'abondance de *G. cubensis* diffère drastiquement entre les deux sites de Jibacoa ainsi que la diversité de l'assemblage de mollusques. Il est notamment intéressant que *G. cubensis* passe de rare à dominante quand les conditions écologiques varient (figure 2.8). A Canasí, l'écosystème est dominé par le thiaride *M. tuberculata* tandis que les

planorbides jouent un rôle important à maintenir des valeurs élevées de diversité. On a trouvé tout le contraire à Frayle où les planorbides sont toujours peu abondants et *G. cubensis* est majoritaire.



**Figure 2.8.** Courbe de rang/abondance d'espèces entre les sites Canasí (cercles) et Frayle (triangles) à Jibacoa.

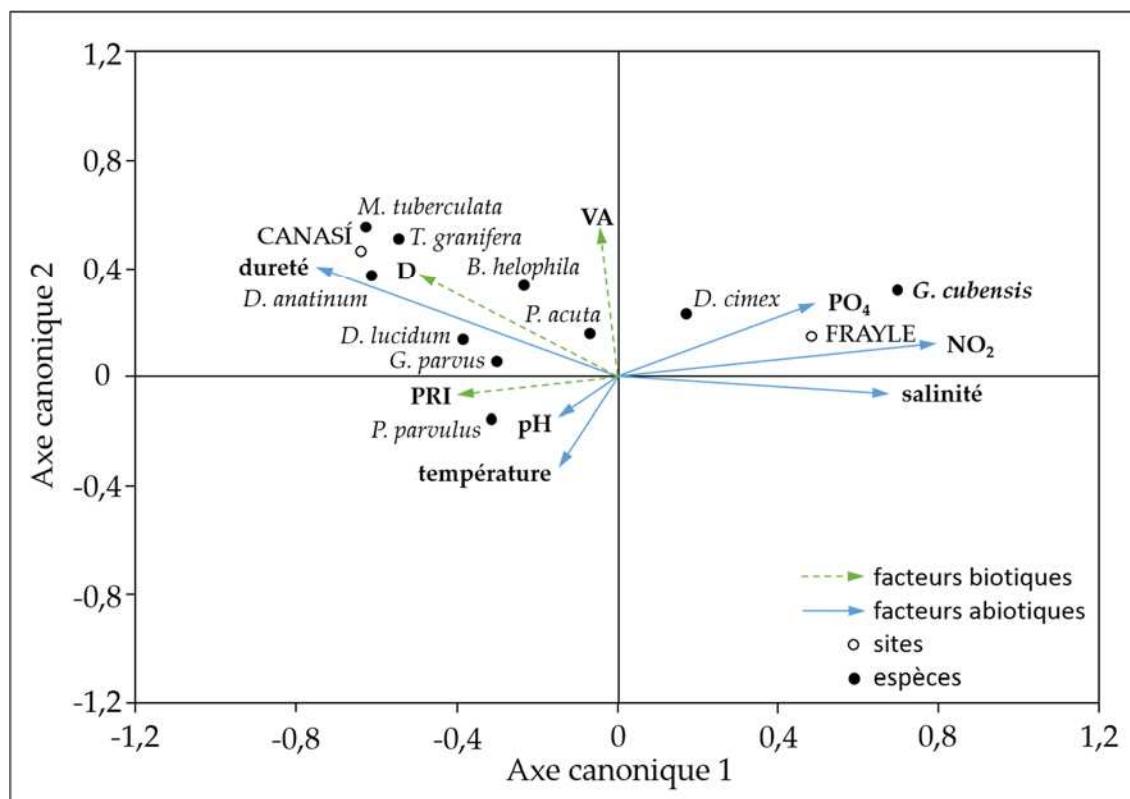
Les deux premiers axes de l'analyse canonique des correspondances réalisée pour la localité de Jibacoa expliquent 58% de la variance et 87% de la variance forcée par les variables explicatives. Les associations entre les espèces et les facteurs écologiques sont supérieures à 0,85 (tableau 2.3).

**Tableau 2.3.** Valeurs propres et pourcentages d'explication de la variance obtenue après l'analyse canonique des correspondances réalisée pour la localité de Jibacoa.

	Axe 1	Axe 2
Valeurs propres	0,789	0,204
Pourcentage	51,573	6,588
Pourcentage cumulé	51,573	58,161
Pourcentage cumulé forcé	75,101	87,234
Corrélations espèces – environnement	0,934	0,871

Le diagramme de dispersion (figure 2.9) montre une relation intéressante entre *G. cubensis* et les concentrations en phosphates et nitrites. En revanche, sa relation avec la diversité et la plupart des espèces est négative. A Canasí presque tous les mollusques sont associés positivement avec la dureté de l'eau et les variations de la diversité. Le pH

et la température ne sont pas fortement associés à une espèce particulière, tandis que la végétation est faiblement reliée aux espèces à Canasí. La relation entre *G. cubensis* et les conditions écologiques à Frayle (beaucoup plus anthropisé) est évidemment plus forte que à Canasí. La salinité qui est légèrement plus haute à Frayle ne paraît pas affecter la population de limnées. La régularité des espèces, plus haute à Canasí, est négativement associée avec la structure de la communauté de mollusques à Frayle et surtout avec *G. cubensis*.

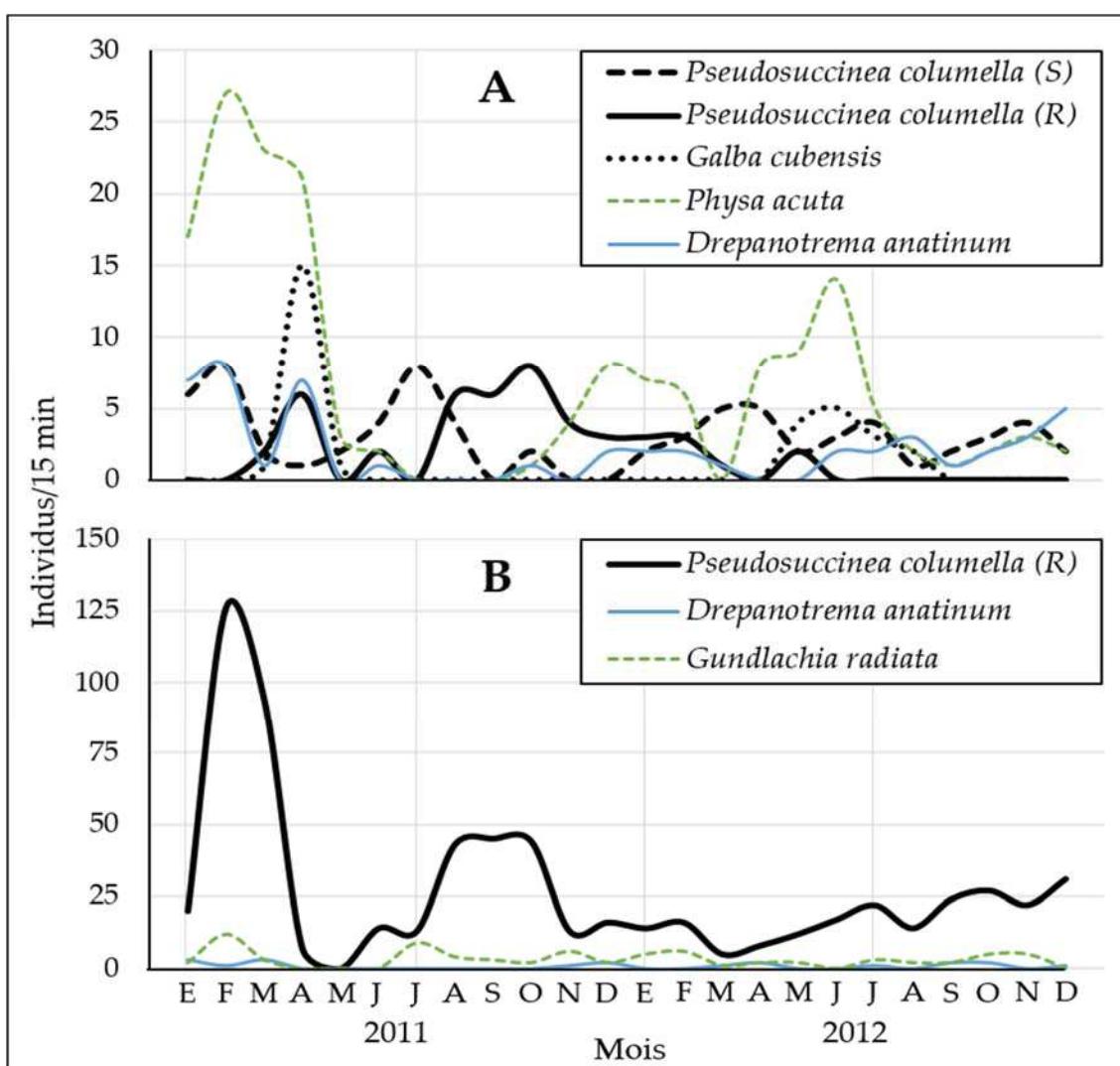


**Figure 2.9.** Diagramme d'ordination de l'analyse canonique des correspondances fait pour la localité de Jibacoa. Les variables environnementales sont représentées par leurs vecteurs et les espèces et sites par des centroïdes (D = diversité de Simpson ; PRI = régularité ; VA = végétation aquatique).

### 2.3.2.2 Localité de La Coca

A La Coca on a trouvé les deux espèces de limnées cubaines, bien que *G. cubensis* soit présente seulement à Los Negrines. En revanche, *P. columella* est très bien établie dans les deux sites échantillonnés. Les autres espèces de mollusques qui complètent l'assemblage à La Coca sont *P. acuta* (Physidae) ainsi que *D. anatinum* et *Gundlachia radiata* (Planorbidae).

Los Negrines, qui s'avère être le site le plus riche, a subi deux colonisations par *G. cubensis*, très éphémères, pendant les mois de mars-avril (2011) et avril-juin (2012). Il est très intéressant de noter que la population de *P. columella* dans ce site est composée d'individus susceptibles et résistants à *F. hepatica* en sympatrie. Les limnées résistantes sont apparues au début de 2011, ont augmenté en effectif jusqu'en octobre 2011, pour finalement décliner jusqu'à disparaître en juin 2012. En revanche, des individus susceptibles se sont maintenus de façon relativement stable pendant toute l'étude (figure 2.10A). Les espèces *P. acuta* et *D. anatinum* ont montré des fluctuations similaires dont la première a été la plus abondante.



**Figure 2.10.** Fluctuations des abondances relatives des espèces de mollusques d'eau douce à La Coca. A = Los Negrines ; B = Segundo Potrero (S et R signifient susceptible et résistant à l'infection par *Fasciola hepatica*).

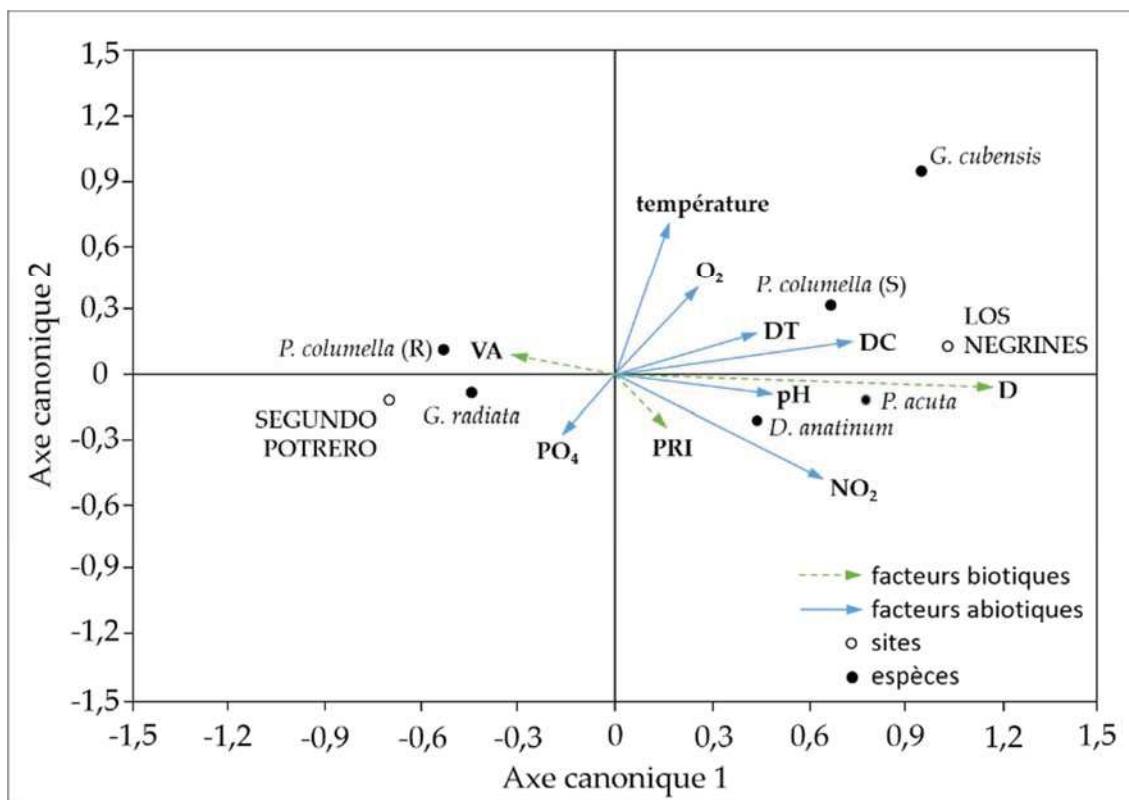
Le scénario a été très différent à Segundo Potrero où tous les individus de *P. columella* étaient résistants à *F. hepatica*. Ce site arbore une diversité très faible avec les espèces de planorbidés *D. anatinum* et *G. radiata* dont les populations sont très peu abondantes. Bien que la population de *P. columella* soit restée stable pendant toute la durée de l'étude, la plus faible abondance a été rencontrée entre mars et avril (figure 2.10B). Le pic d'abondance le plus haut a eu lieu en janvier-février 2011. Une légère tendance à la recolonisation a été observée à partir de mai 2012.

L'analyse canonique des correspondances réalisée entre les espèces et les facteurs écologiques à La Coca explique par les deux premiers axes 60% de la variance et 89% de la variance forcée par les variables explicatives (tableau 2.4). Cette analyse fait ressortir une relation particulière entre les abondances des individus susceptibles et résistants de *P. columella* et les variations du pH et dureté de l'eau (figure 2.11).

**Tableau 2.4. Valeurs propres et pourcentages d'explication de la variance obtenue après l'analyse canonique de correspondances réalisée pour la localité de La Coca.**

	Axe 1	Axe 2
Valeurs propres	0,808	0,108
Pourcentage	52,818	7,073
Pourcentage cumulé	52,818	59,89
Pourcentage cumulé forcé	78,325	88,813
Corrélations espèces – environnement	0,967	0,839

Une forte relation négative entre le pH et l'abondance des individus résistants témoigne d'une préférence pour une eau légèrement acide. Cette relation est inverse chez les individus susceptibles qui sont plus abondants quand le pH oscille entre 7 et 8. Il est très intéressant de remarquer que la population de *P. columella* résistante à Segundo Potrero se trouve dans des eaux particulièrement peu dures (2°d - 4°d). En revanche la dureté, de l'eau à Los Negrines, où les *P. columella* sont majoritairement susceptibles, est plus forte et positivement corrélée à l'abondance de ces individus.



**Figure 2.11.** Diagramme d'ordination de l'analyse canonique des correspondances fait pour la localité de Jibacoa. Les variables environnementales sont représentées par leurs vecteurs et les espèces et sites par des centroïdes (D = diversité de Simpson ; PRI = régularité ; VA = végétation aquatique ; DT=dureté totale ; DC=dureté en carbonates).

L'espèce *G. cubensis* ne semble pas fortement associée avec les variables étudiées. Cependant, cette espèce n'a connu deux explosions démographiques que dans le site dont les facteurs environnementaux ont les valeurs les plus élevées. La diversité d'espèces est associée aux populations présentes à Los Negrines tandis que la régularité a des valeurs très faibles. Dans ce site la phye *P. acuta* est dominante. En revanche, sa présence ne semble pas affecter la population de *P. columella*. Il ne paraît pas exister de relation entre les individus susceptibles de *P. columella* et la saisonnalité des précipitations. En revanche, la population résistante à Segundo Potrero augmente légèrement avec la saison de pluie.

Les relations entre les abondances de limnées et les indices de diversité dans tous les sites étudiés sont présentés dans le tableau 2.5. On observe notamment une relation inverse entre la diversité et les abondances de *G. cubensis* et *P. columella* (individus résistants). En revanche, l'abondance en individus susceptibles de *P. columella* semble indépendante de la diversité ou la régularité de l'assemblage de mollusques.

**Tableau 2.5.** Corrélations entre les abondances de *G. cubensis* et *P. columella* (S = susceptible et R = résistante) et les indices de diversité (Simpson) et régularité (PRI) dans les sites étudiés. N = nombre d'observations, R = coefficient de corrélation de Spearman, P = probabilité associée.

Relation	N	R	P
<i>G. cubensis</i> - D	48	-0,57321	0,00897
<i>G. cubensis</i> - PRI	48	-0,37119	0,00939
<i>P. columella</i> (S) - D	24	-0,15441	0,47126
<i>P. columella</i> (S) - PRI	24	-0,04945	0,81850
<i>P. columella</i> (R) - D	48	-0,63895	0,00001
<i>P. columella</i> (R) - PRI	48	-0,64280	0,00001

### 2.3.3 Discussion

Les résultats obtenus dans chacun des sites mettent en évidence des caractéristiques écologiques très différentes pour chaque espèce de limnée. Ces caractéristiques relèvent d'une part des conditions du milieu (paramètres physico-chimiques de l'eau) et d'autre part des relations avec les autres espèces dans l'assemblage de mollusques. Ces deux facettes conditionnent le rôle écologique de chaque limnée (compétiteur, hôte intermédiaire de parasites, etc.) dans l'écosystème.

L'espèce *G. cubensis* est considérée comme amphibia (Perera, 1996) et pour cette raison l'abondance et la distribution de ses populations ne sont pas fortement affectées par les variables aquatiques. L'absence de relation directe entre son abondance et les paramètres physico-chimiques de l'eau résulte probablement de sa large tolérance vis-à-vis de ces variables. Cependant, *G. cubensis*, qui vit près de l'eau et se trouve occasionnellement submergée peut être sensible aux variations brusques de paramètres comme le pH ou les concentrations en quelques ions. Une espèce très proche, *G. truncatula*, est très similaire à *G. cubensis* pour ce qui est de son amphibiase (Goumghar *et al.* 2004). Cette espèce est décrite comme l'hôte intermédiaire majoritaire de *F. hepatica* en France (Rondelaud *et al.* 2006) et dans quelques régions de l'Afrique (Mekroud *et al.* 2006) et de l'Amérique du Sud (Bargues *et al.* 2007). Son amphibiase et sa plasticité écologique sont probablement déterminantes pour sa large distribution et donc son rôle comme vecteur de fasciolose. La tolérance écologique chez *G. cubensis* a été déjà montrée par Perera (1996) dans quelques sites à Cuba. Notre étude révèle de plus une association positive entre l'abondance de *G. cubensis* et la salinité, ce qui

renforce l'idée d'une large tolérance écologique. De même, son abondance est liée aux concentrations en nitrites et phosphates, ce qui témoigne de sa capacité à occuper des habitats fortement pollués par les activités humaines.

Les résultats obtenus pour *P. columella* sont différents. Cette espèce est beaucoup plus aquatique que *G. cubensis* (Pointier *et al.* 2005) et par conséquent plus affectée par les facteurs physico-chimiques de l'eau. Une corrélation positive entre l'abondance en *P. columella*, le pH et la concentration en nitrites a été déjà observée par Gutiérrez (2004) dans une étude menée à Pinar del Río, Cuba. Un apport majeur de notre étude est de considérer séparément les individus de *P. columella* susceptibles versus résistants à l'infection fasciolienne. Ainsi, les conditions de pH, dureté et les concentrations en phosphates et nitrites pour la population susceptible sont les mêmes que ceux rapportés par Perera (1996) dans d'autres localités à Cuba. En revanche, la population résistante présente une tolérance remarquable aux faibles valeurs de dureté et à une acidité de l'eau. Ce phénomène pourrait s'expliquer par trois hypothèses non exclusives : 1) ces conditions seraient nécessaires à la survie de ces individus résistants, qui auraient donc une écologie totalement différente de celle des individus sensibles. 2) Les conditions d'acidité et de faible dureté de l'eau ne seraient pas favorables aux autres espèces de mollusques, ce qui favoriserait les *P. columella* par relâchement de la compétition interspécifique. En conditions expérimentales, il a été observé que les *P. columella* résistantes sont faiblement compétitives par rapport aux individus sensibles (Gutiérrez *et al.* 2005a). Il est donc difficile d'expliquer que les individus résistants se maintiennent dans les endroits peu favorables aux autres mollusques à moins que les événements de colonisation soient très rares et que des individus résistants aient été les seuls à s'installer dans ces zones. En cas de colonisation du site par des individus sensibles, on pourrait donc s'attendre à ce que ceux-ci supplantent les résistants. (3) Une troisième explication pourrait être que les fortes prévalences parasitaires ans ces sites favorisent les individus résistants au détriment des sensibles.

En ce qui concerne la relation entre abondance des limnées et diversité des mollusques, les résultats diffèrent entre les espèces. La corrélation négative entre l'abondance de *G. cubensis* et la diversité est probablement due à ses faibles aptitudes compétitives envers les autres espèces dans certaines conditions. Une relation

particulièrement négative a été observée entre *G. cubensis* et *T. granifera* (Thiaridae) par Gutiérrez (2004), très similaire à ce qu'on a trouvé à Jibacoa. Les thiariidés sont connus comme agents compétiteurs des mollusques hôtes intermédiaires tels que les espèces de *Biomphalaria* dans la région Caraïbe (Pointier et Jourdane, 2000). Les espèces *T. granifera* et *M. tuberculata* peuvent être hautement compétitrices dans les écosystèmes stables, avec peu de variations climatiques, et peu perturbés par l'Homme. Cet effet a été montré à Cuba par Perera (1996) en étudiant deux cressonnières dans la région de Batabanó (La Havane). Dans cette étude, les populations de *T. granifera* ne sont jamais stables, tandis que *G. cubensis* est présente de manière ininterrompue pendant toute l'année. Les deux écosystèmes étudiés à Jibacoa montrent des caractéristiques opposées. Dans le cas de Frayle, l'endroit est très instable à cause des activités humaines ; hormis *G. cubensis*, les seules espèces établies sont des planorbidés caractérisés par un taux de reproduction élevé. A Canasí en revanche, le site est plus stable et peuplé par plusieurs espèces. Cette diversité spécifique plus élevée entraîne une diminution de l'abondance en *G. cubensis* et ce faisant, diminue probablement la probabilité de transmettre *F. hepatica*.

Dans le cas de *P. columella*, on ne trouve pas de relation entre diversité en mollusques et abondance des individus susceptibles. Ces résultats sont cohérents avec une étude menée dans deux sites à Pinar del Río (Cuba) qui montre des populations de *P. columella* très stables pendant huit mois en coexistence d'avec autres espèces (Gutiérrez *et al.* 2005b). Il semblerait donc que les *P. columella*, au moins les souches sensibles, ne souffrent pas de la compétition avec d'autres espèces de mollusques. En revanche, au cours de notre étude nous avons observé une relation négative entre abondance des individus résistants et la diversité ou la régularité globales. Ceci pourrait être interprété comme un coût écologique à la résistance, se soldant par un moins bon potentiel compétiteur (Webster & Woolhouse, 1999).

## 2.4 Diversité génétique des limnées à Cuba

### Article 4 : en préparation

#### **Genetic diversity of the two Lymneid snails vectors of fasciolosis in Cuba: *G. cubensis* and *Pseudosuccinea columella***

AA. Vázquez, M. Lounnas, A. Dia, P. Alda, J. Sánchez, K. Sartori, P. David, J.-P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès

Les études génétiques sont une des approches essentielles pour aider à mieux comprendre les interactions hôtes-parasites (De Meeus *et al.* 2007). Ces types d'études ont déjà fourni des résultats très intéressants, par exemple sur le modèle *Biomphalaria/Schistosoma* (Bech *et al.* 2010) pour lequel la connaissance de la compatibilité mollusque/parasite a amélioré la compréhension et le contrôle de la schistosomiase (Prugnolle *et al.* 2006).

Appliquées au système douve-limnées, ces approches permettent notamment de comprendre qui sont les hôtes capables de transmettre le parasite (Bargues *et al.* 2003 ; Correa *et al.* 2010) ou encore quelles sont les caractéristiques des populations représentant les plus grands risques épidémiologiques (Meunier *et al.* 2001 ; Lounnas *et al.*, soumis : article No. 6). Les études de phylogénie moléculaire ont éclairé les relations évolutives entre les genres et espèces qui peuvent être concernés par les programmes de contrôle de fasciolose (Correa *et al.* 2010). De plus, les études génétiques permettent également d'identifier formellement des espèces cryptiques (qu'on est incapable d'identifier sur des critères morpho-anatomiques) et de pouvoir ainsi caractériser leur écologie et leur susceptibilité vis-à-vis de la douve (Correa *et al.* 2011 ; Standley *et al.* 2013 ; Alda *et al.*, soumis : article No. 2). Enfin, l'étude de la structure génétique des populations permet d'accéder (1) aux caractéristiques bio-écologiques du mollusque, (2) à l'histoire de ses populations et (3) aux relations entre biologie des populations et caractéristiques environnementales. Ces sujets ont été largement abordés chez *Galba truncatula*. (1) Par exemple, les forts écarts à l'équilibre d'Hardy-Weinberg observés (Meunier *et al.* 2001) sont essentiellement expliqués par la prédominance de l'autofécondation chez ce mollusque, ce qui a été confirmé par une approche expérimentale combinée à une étude de génétique des populations (Meunier *et al.* 2004a). Il a de plus été montré que la faible diversité génétique intra-population et la

forte différenciation entre populations, indépendante de la distance, sont expliquées par de forts effets de la dérive génétique (Meunier *et al.* 2004b). En effet, *G. truncatula* vit le plus souvent dans des habitats temporaires, dont les assèchements causent de très forts goulets d'étranglement, suivis de recolonisation par quelques individus. (2) Toujours chez *Galba truncatula*, Meunier *et al.* (2001) ont montré une absence totale de différenciation génétique entre populations échantillonnées sur l'Altiplano bolivien, plus forte zone d'endémie de la fasciolose : tous les individus étudiés possédaient le même génotype multilocus. En cohérence avec des études malacologiques, ces auteurs interprètent ce résultat comme une introduction très récente (quelques dizaines d'années) de ce vecteur sur l'Altiplano. Cette introduction réussie aurait ainsi permis à la grande douve de s'implanter dans cette zone. (3) En étudiant la diversité génétique des populations de limnée tronquée dans un réseau hydrographique en France, Hurtrez-Boussès *et al.* (2010) ont mis en évidence un isolement par la distance mesurée le long des drains du réseau hydrographique. Ce résultat apporte un éclairage sur la dispersion des mollusques (de proche en proche, en suivant le flux d'eau) et peut permettre de mieux comprendre les voies de colonisation des systèmes hydrographiques. De façon cohérente, Garcia (2009) a montré que la diversité génétique de *G. truncatula* au Maroc est bien plus faible dans des réseaux d'irrigation construits que dans des systèmes moins anthropisés. Ce résultat est particulièrement intéressant si on considère que la compatibilité et la susceptibilité d'infection peuvent varier avec la diversité génétique.

Afin de mieux comprendre la biologie des populations de limnées à Cuba, nous avons souhaité leur appliquer ce type d'approche. En contexte insulaire, les événements d'introductions sont moins fréquents que sur les continents. De plus, le fait d'être sur une surface relativement faible et surtout bien délimitée permet d'espérer que les prospections sont mieux documentées que sur les continents.

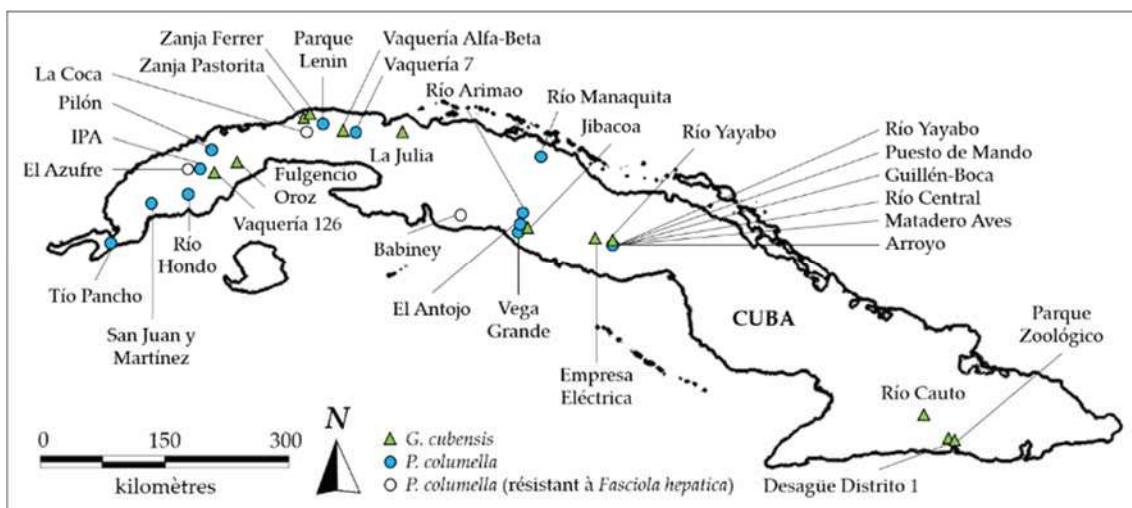
Pour caractériser la diversité génétique, les marqueurs microsatellites sont bien adaptés (voir chapitre 1). Ce marqueurs avaient déjà été développés pour *P. columella* (Nicot *et al.* 2008), mais n'étaient pas disponibles pour *G. cubensis*. Nous avons donc commencé, avec Manon Lounnas (Lounnas *et al.*, soumis : article No. 5), par mettre au point un jeu de marqueurs microsatellites chez *G. cubensis*.

Ici, nous présentons la première étude à Cuba qui décrit la diversité génétique et la structure des populations des limnées vectrices de *F. hepatica*.

## 2.4.1 Matériel et Méthodes

### 2.4.1.1 Populations de limnées utilisées pour les études de génétique de populations

On a échantillonné 12 populations de *G. cubensis* et 20 de *P. columella* à Cuba (figure 2.12) en tenant compte de la distribution connue pour chaque espèce. Trois populations de *P. columella* avaient les caractéristiques phénotypiques (pigmentation du manteau) caractéristiques des individus résistants à *F. hepatica* (Gutiérrez *et al.* 2003). Pour ce qui est de *G. cubensis*, les sites de Fulgencio Oroz, Vaqueria 126 et Vaqueria Alfa-Beta correspondent à des foyers majeurs de transmission de la fasciolose. Tous les individus ont été collectés sur le terrain à la main et immédiatement stockés dans de l'éthanol (95%). Tous les échantillons ont été rapportés au laboratoire en vue d'analyses ultérieures.



**Figure 2.12.** Populations de limnées cubaines (*Galba cubensis* et *Pseudosuccinea columella*) utilisées pour les études de génétique de populations.

Chaque individu a été disséqué à l'aide d'une loupe binoculaire pour la recherche de stades larvaires de trématodes.

### 2.4.1.2 Extraction d'ADN et amplification

Une petite partie (2 mm<sup>2</sup>) du pied de chaque individu a été utilisée pour l'extraction d'ADN. L'extraction a été faite en utilisant la résine Chelex, selon le protocole de Estoup et Martin (1996), adapté pour des plaques de 96 puits. Le tissu de chaque individu a été séché (élimination de l'alcool) et placé dans un puits contenant 100 µL de Chelex®100 (5%) (Bio-Rad Laboratories, Inc.) et 5 µL de protéinase K (10 mg/mL) (Promega). La plaque a été agitée au vortex et incubée durant une nuit à 56°C, puis 10 min à 95°C. Le

mix a été centrifugé à 6000 xg pendant 6 minutes. Le surnageant contenant l'ADN a été récupéré et conservé au congélateur à -20°C.

#### *2.4.1.3. Amplification de loci de microsatellites*

Les amplifications ont été conduites dans des thermocycleurs MJ-Research PTC 100 96-puits. Les amores ont été marquées par fluorescence pour les utiliser dans un séquenceur automatique ABI (ABI Prism 310 Gentic Analyser, Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA).

##### *2.4.1.3.1. Galba cubensis*

##### **Article 5 : soumis à *Canadian Journal of Zoology***

##### **Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci in an intermediate host of fascioliasis, the freshwater snail *Galba cubensis* (Mollusca, Gastropoda)**

M. Lounnas, A.A. Vázquez, P. Alda, K. Sartori, R. Galzin, J.-P. Pointier, P. David, S. Hurtrez-Boussès

On a amplifié 12 loci microsatellites chez *G. cubensis* (Lounnas et al. soumis : article No. 5) : GCU01 (n° d'accession à Genbank : KT285812), GCU05 (KT285813), GCU13 (KT285814), GCU21 (KT285816), GCU23 (KT285817), GCU26 (KT285818), GCU27 (KT285819), GCU30 (KT285820), GCU31 (KT285821), GCU34 (KT285822), GCU37 (KT285823), et GCU39 (KT285824). Chaque locus a été amplifié par PCR en utilisant 2 µL d'ADN de chaque individu dans un volume final de réaction de 20 µL contenant 2,5 µL buffer 10X (Roche), 2 µL MgCl<sub>2</sub> 25 nmol/L, 2,4 µL dNTPs 2mmol/L (Invitro-gen/Life Technology), 1 µL de chaque amorce (10 pmol) et 0,2 µL de *Taq* ADN polymérase 1U (Roche). Le programme d'amplification a consisté en 10 min de dénaturation à 95°C, puis 40 cycles comportant 30 s à 95°C, 30 s à température d'hybridation (55°C) et 60 s à 72°C, suivis d'une étape finale d'elongation à 72°C pendant 10 min.

#### 2.4.1.3.2. *Pseudosuccinea columella*

Dans le cas de *P. columella*, 8 loci microsatellites (Nicot *et al.* 2008) ont été amplifiés : PCO01 (n° d'acquisition à Genbank EU04295), PCO02 (EU049296), PCO07 (EU049299), PCO12 (EU049303), PCO13 (EU049304) et PCO20 (EU049309). Chaque locus a été amplifié par PCR en utilisant 1 µL d'ADN de chaque individu dans un volume final de réaction de 10 µL contenant 2 µL buffer 5X (Promega), 1 µL MgCl<sub>2</sub> 25nmol/L, 0,5 µL dNTPs 2mmol/L (Invitro-gen/Life Technology), 0,2 µL de chaque amorce (10 pmol) et 0,2 µL de *Taq* ADN polymérase 1U (Promega). Le programme d'amplification a consisté en 10 min de dénaturation initiale à 94°C puis 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 55°C (température d'hybridation) et 30s à 72°C, puis une étape finale d'elongation à 72°C pendant 10 min.

#### 2.4.1.4. Génotypage de loci de microsatellites

Un microlitre du produit PCR de chaque échantillon a été dilué 1/100. Un mix contenant 1 µL du produit PCR dilué, 0,25 µL de marqueur de taille (GENESCAN 500 LIZ, Applera) et 15 µL Hi-Di Formamide (20 µL QSP) a été utilisé pour les électrophorèses automatiques sur séquenceur (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA). La lecture des tailles des allèles a été faite en utilisant le logiciel GeneMapper® v. 4.0 (Applied Biosystems™).

#### 2.4.1.5. Analyses de génétique de populations

Les statistiques courantes de génétique de populations comme le nombre moyen d'allèles (*a*), les hétérozygosités observée (*H<sub>o</sub>*) et attendue (*H<sub>e</sub>*), et le *F<sub>IS</sub>* ont été estimés pour chaque locus. La différenciation par paire de populations (*F<sub>ST</sub>*) a été aussi évaluée. Tous les calculs ont été faits en utilisant le logiciel FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). La correction de Bonferroni a été utilisée pour les tests multiples (Rice, 1984). Le taux d'autofécondation (*s*) a été estimé à partir des valeurs de *F<sub>IS</sub>* :  $s = 2F_{IS}/(1+F_{IS})$  (Hartl et Clark, 1997).

Les génotypes multilocus (GTML) ont été obtenus pour les individus avec tous les loci microsatellites amplifiés, et ils ont été codés par lettre (une lettre = un GTML). On a testé l'isolement par distance (Rousset, 1997) grâce à un test de Mantel en utilisant le logarithme népérien (ln) de la distance géographique euclidienne ("à vol d'oiseau")

entre populations (km) et la différenciation génétique transformée en  $F_{ST}/(1-F_{ST})$ . L'analyse a été faite avec le logiciel FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2001).

Les distances génétiques entre populations de Nei (1972, 1978) ont été estimées par le logiciel Genetix (Belkhir *et al.* 2004). La matrice de distances obtenue a servi à construire un réseau neighbour-joining (NJ), grâce au logiciel SplitsTree4 (Huson et Bryant, 2013).

## 2.4.2. Résultats

### 2.4.2.1. Dissection de mollusques et infection par des parasites

Au total 257 individus de *G. cubensis* et 329 de *P. columella* provenant de 12 et 20 localités respectivement, ont été disséqués. La dissection de mollusques a montré l'infection par *F. hepatica* de deux individus de la localité IPA. On n'a pas trouvé d'infection par d'autres espèces de parasites dans aucune des localités étudiées.

### 2.4.2.2. Diversité génétique chez l'espèce *Galba cubensis* à Cuba

Trois loci (GCU01, GCU13 et GCU39) se sont révélés monomorphes pour les populations étudiées. Tous les autres sont polymorphes avec une moyenne d'allèles par locus de 2,33 ( $\pm 0,49$  SD).

**Table 2.6.** Nombre d'allèles (a), richesse allélique (r), hétérozygotie attendue ( $H_e$ ), et coefficient génétique de différenciation ( $G_{ST}$ ) chez *Galba cubensis* par locus.

Locus	a	r	$H_e$	$G_{ST}$
GCU01	2	1,025	0,014	0,020
GCU05	2	1,137	0,051	0,892
GCU13	2	1,116	0,064	0,077
GCU21	3	1,080	0,039	0,746
GCU23	2	1,211	0,112	0,613
GCU26	3	1,103	0,056	0,417
GCU27	2	1,233	0,121	0,583
GCU30	3	1,140	0,075	0,667
GCU31	2	1,214	0,074	0,851
GCU34	2	1,105	0,054	0,430
GCU37	3	1,412	0,224	0,539
GCU39	2	1,030	0,016	0,012
Moyenne	2,333	1,150	0,075	0,667

Les paramètres de génétique des populations par site étudié sont donnés dans le tableau 2.7. Le nombre moyen d'allèles par locus varie, pour les différentes populations, entre 1 et 2,3 (moyenne :  $1,37 \pm 0,38$  SD). Quatre populations sont entièrement monomorphes pour l'ensemble des loci, tandis que pour les autres populations, on détecte du polymorphisme à au moins un locus. La diversité allélique est faible dans tous les cas (maximum à Zanja Pastorita :  $2,33 \pm 0,49$  SD). Les valeurs d'hétérozygotie attendue sont également faibles (moyenne  $0,075 \pm 0,064$  SD).

Les taux d'hétérozygotie observée sont faibles dans tous les cas (moyenne  $0,1 \pm 0,114$  SD) et les écarts la panmixie élevés et significatifs (moyenne  $0,825 \pm 0,169$  SD). Il en découle donc des taux d'autofécondation estimés très forts (tous supérieurs à 79%, sauf à Fulgencio Oroz : 64%)

**Tableau 2.7.** Nombre moyen d'allèles (a), hétérozygoties observée ( $H_o$ ) et attendue ( $H_e$ ),  $F_{IS}$  (probabilité après correction de Bonferroni) et taux d'autofécondation estimé (s) pour chaque population chez *Galba cubensis* (N : nombre d'individus analysés).

Population	N	a ( $\pm SD$ )	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$ (p)	s
Desagüe Distrito 1	24	1,000 ( $\pm 0$ )	0	0	NA	NA
Empresa Eléctrica	25	1,333 ( $\pm 0,49$ )	0,1 ( $\pm 0,3$ )	0,04 ( $\pm 0,06$ )	0,819 (<0,01)	0,900
Fulgencio Oroz	5	1,583 ( $\pm 0,49$ )	0,15 ( $\pm 0,36$ )	0,15 ( $\pm 0,23$ )	0,467 (NS)	0,636
Jibacoa	16	1,000 ( $\pm 0,51$ )	0,1 ( $\pm 0,3$ )	0,19 ( $\pm 0,22$ )	0,944 (<0,01)	0,971
La Julia	10	1,083 ( $\pm 0$ )	0	0	NA	NA
Parque Zoológico	25	1,333 ( $\pm 0,28$ )	0	0,04 ( $\pm 0,15$ )	1,000 (<0,01)	1
Río Cauto	23	1,583 ( $\pm 0,51$ )	0,1 ( $\pm 0,44$ )	0,09 ( $\pm 0,14$ )	0,917 (<0,01)	0,956
Río Yayabo	28	1,166 ( $\pm 0,38$ )	0,4 ( $\pm 0,99$ )	0,17 ( $\pm 0,21$ )	0,858 (<0,01)	0,923
Vaquería Alfa-Beta	30	1,583 ( $\pm 0,51$ )	0	0,06 ( $\pm 0,15$ )	1,000 (<0,01)	1
V126	18	1,416 ( $\pm 0,67$ )	0,2 ( $\pm 0,4$ )	0,08 ( $\pm 0,09$ )	0,706 (<0,01)	0,827
Zanja Ferrer	25	1,083 ( $\pm 0,29$ )	0,1 ( $\pm 0,3$ )	0,09 ( $\pm 0,13$ )	0,882 (<0,01)	0,937
Zanja Pastorita	28	2,333 ( $\pm 0,49$ )	0,05 ( $\pm 0,22$ )	0,01 ( $\pm 0,03$ )	0,657 (NS)	0,792

Concernant la différenciation entre populations, le  $F_{ST}$  global est de 0,666 ( $p = 0,011$ ). Les valeurs de  $F_{ST}$  entre paires de populations sont présentées dans le tableau 2.8. La plupart des paires de populations sont significativement différencierées. Le fait que la population de Fulgencio Oroz ne soit significativement différencierée d'aucune des autres peut s'expliquer par le faible nombre d'individus (5) étudiés pour cette population. En revanche, on peut souligner que les deux autres populations correspondant aux sites de transmission de la fasciolose (Vaquería 126 et Vaquería Alfa-Beta) ne présentent pas non plus de différenciation significative entre elles, alors qu'elles sont significativement différencierées de la plupart des autres populations étudiées. On a observé de l'isolement par la distance globalement (test de Mantel,  $R^2 = 17,09 ; P = 0,0001$ ).

**Tableau 2.8.** Valeurs de  $F_{ST}$  entre populations chez *Galba cubensis* (populations : VAB = Vaquería Alfa-Beta, CA = Río Cauto, DD = Desagüe Distrito 1, EE = Empresa Eléctrica, FO = Fulgencio Oroz, JI = Jibacoa, LJ = La Julia, PZ = Parque Zoológico, RY = Río Yayabo, SB = Surgidero Batabanó, ZF = Zanja Ferrer, ZP = Zanja Pastorita).

	DD	EE	FO	JI	LJ	PZ	CA	RY	VAB	V126	ZF	ZP
DD	0											
EE	<b>0,884*</b>	0										
FO	0,791	<b>0,809*</b>	0									
JI	<b>0,756*</b>	<b>0,622*</b>	0,466	0								
LJ	<b>1,000*</b>	<b>0,834*</b>	0,823	0,700	0							
PZ	0,471	<b>0,820*</b>	0,628	<b>0,687*</b>	<b>0,902*</b>	0						
CA	<b>0,890*</b>	<b>0,880*</b>	0,628	0,733	0,844	<b>0,752*</b>	0					
RY	<b>0,406*</b>	0,000	0,414	0,444	0,597	<b>0,450*</b>	0,661	0				
VAB	<b>0,836*</b>	<b>0,661*</b>	0,645	<b>0,663*</b>	<b>0,680*</b>	<b>0,805*</b>	<b>0,780*</b>	<b>0,517*</b>	0			
V126	<b>0,811*</b>	<b>0,718*</b>	0,553	<b>0,616*</b>	<b>0,703*</b>	<b>0,754*</b>	<b>0,739*</b>	<b>0,490*</b>	0,192	0		
ZF	<b>0,780*</b>	<b>0,637*</b>	0,503	0,585	0,637	<b>0,749*</b>	0,737	0,461	0,060	-0,013	0	
ZP	<b>0,977*</b>	<b>0,764*</b>	0,897	<b>0,778*</b>	<b>0,906*</b>	<b>0,916*</b>	<b>0,905*</b>	<b>0,618*</b>	<b>0,425*</b>	<b>0,702*</b>	<b>0,585*</b>	0

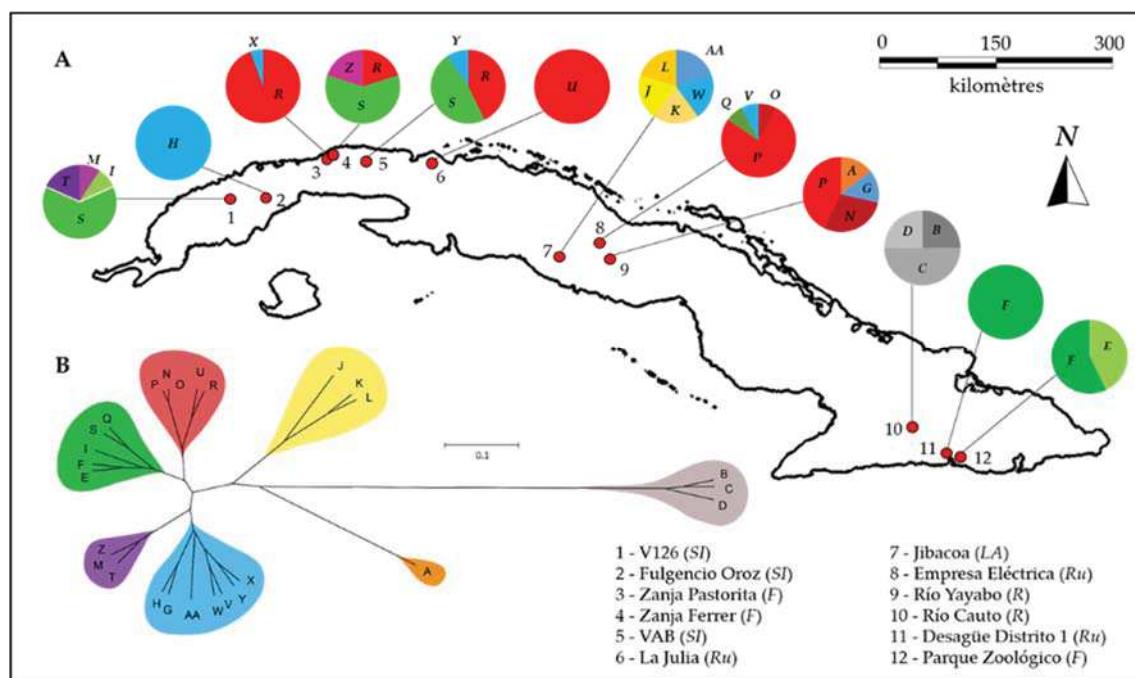
\*différenciation significative après correction de Bonferroni (valeur ajustée de  $P = 0,000758$ )

Au niveau des génotypes multilocus (GTML), on a observé 27 GTML différents parmi les 12 populations étudiées chez *G. cubensis* (tableau 2.9 et figure 2.13). Le nombre de GTML par population varie entre 1 et 5 avec une moyenne de 2,75 ( $\pm 1,35$  SD) ; la moyenne d'individus par géotype est de 4,22 ( $\pm 6,97$  SD). La plupart des GTML ne se retrouve que dans une population, à l'exception de quatre GTML (*F, P, R, S*) qui sont communs à plusieurs populations. Les populations qui partagent des GTML sont proches géographiquement. Il est aussi intéressant de noter ces GTML les plus répandus sont aussi les plus abondants à l'intérieur des populations.

**Table 2.9.** Populations, tailles d'échantillons et génotypes multilocus chez *Galba cubensis* pour 12 loci microsatellites. (N: individus analysés après l'exclusion des individus avec un locus non amplifié).

Population	N (nombre de GTML différents)	Noms des GTML (nombre d'individus)
Desagüe Distrito 1	11 (1)	F (11)
Empresa Eléctrica	13 (4)	O (1), P (10), Q (1), V (1)
Fulgencio Oroz	1 (1)	H (1)
Jibacoa	5 (5)	J (1), K (1), L (1), W (1), AA (1)
La Julia	4 (1)	U (4)
Parque Zoológico	14 (2)	E (6), F (8)
Río Cauto	4 (3)	B (1), C (2), D (1)
Río Yayabo	7 (4)	A (1), G (1), N (2), P (3)
Vaquería Alfa-Beta	21 (3)	R (9), S (10), Y (2)
V126	11 (4)	I (1), M (1), S (7), T (2)
Zanja Ferrer	5 (3)	R (1), S (3), Z (1)
Zanja Pastorita	18 (2)	R (17), X (1)

La figure 2.13 montre la distribution géographique des différents GTML chez *G. cubensis* à Cuba. Le réseau formé à partir des distances génétiques (Nei) affiche sept regroupements de génotypes les plus proches. On peut observer que ces clusters sont plus au moins répandus à Cuba et seulement trois populations (Jibacoa, Río Yayabo et Río Cauto) présentent des GTML uniques d'un seul cluster.



**Figure 2.13.** Génotypes multilocus (GTML) à partir de 12 loci de microsatellites chez la limnée *Galba cubensis*. A = Distribution géographique à Cuba des différents GTML par population. B = Réseau formé en utilisant la méthode UPGMA à partir des distances génétiques (Nei) de chaque GTML (des couleurs différentes correspondent à des clusters différents). SI = savane inondée, F = fossé collecteur d'effluents, Ru = Ruisseau, LA = lac artificiel, R = rivière.

#### 2.4.2.3. Diversité génétique chez l'espèce *Pseudosuccinea columella* à Cuba

Les six loci étudiés sont polymorphes, particulièrement PCO12 qui présente 7 allèles différents à Cuba (Tableau 2.10).

Tous les paramètres de génétique des populations pour chaque population sont résumés dans le tableau 2.11.

La diversité allélique dans les 20 populations étudiées est très faible (moyenne  $2,034 \pm 0,646$  SD). Cinq populations (Pilón, El Antojo, Puesto de Mando, Guillén-Boca et Arroyo) sont entièrement monomorphes pour les six loci étudiés. Ces populations monomorphes sont réparties sur l'ensemble de la région étudiée. Il est intéressant de souligner que les deux populations qui ont la plus grande variation allélique (La Coca et Babiney :  $2,17 \pm 0,75$  SD) sont toutes deux composées d'individus résistants à l'infection par la douve (la troisième population résistante, El Azufre, présente une diversité plus faible :  $1,17 \pm 0,41$  SD).

Les hétérozygosités attendues (moyenne  $0,1 \pm 0,09$  SD) et observées (moyenne  $0,03 \pm 0,056$  SD) sont faibles. Sauf dans la population de Rio Arimao où les hétérozygosités observées et attendues sont similaires ( $F_{IS} = 0,038$ , NS), toutes les populations étudiées ont des  $F_{IS}$  élevés et significatifs après correction de Bonferroni ( $F_{IS}$  moyen  $0,667 \pm 0,313$  SD). Excepté donc dans la population de Rio Arimao, les taux d'autofécondation estimés sont forts ( $> 64\%$ ).

**Tableau 2.10.** Nombre d'allèles (a), richesse allélique (r), hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et attendue ( $H_e$ ), et coefficient génétique de différenciation ( $G_{ST}$ ) chez *Galba cubensis* par locus.

Locus	a	r	$H_e$	$G_{ST}$
Pco01	4	2,093	0,066	0,756
Pco02	4	1,374	0,086	0,053
Pco07	4	2,358	0,056	0,784
Pco12	7	3,109	0,276	0,464
Pco13	3	1,446	0,072	0,268
Pco20	3	1,828	0,060	0,643

**Tableau 2.11.** Moyenne du nombre d'allèles (a), hétérozygoties observée ( $H_o$ ) et attendue ( $H_e$ ),  $F_{IS}$  (probabilité après correction de Bonferroni) et taux d'autofécondation estimé (s) pour chaque population chez *Pseudosuccinea columella* (N : nombre d'individus analysés).

Population	N	a ( $\pm SD$ )	$H_o$ ( $\pm SD$ )	$H_e$ ( $\pm SD$ )	$F_{IS}$ (p)	s
'La Coca	37	2,17( $\pm 0,75$ )	0,056 ( $\pm 0,074$ )	0,304( $\pm 0,227$ )	0,816 (<0,01)	0,90
'Babiney	26	2,17( $\pm 0,75$ )	0,068 ( $\pm 0,059$ )	0,249( $\pm 0,197$ )	0,726 (<0,01)	0,84
IPA	19	2,00( $\pm 1,10$ )	0,068 ( $\pm 0,121$ )	0,127( $\pm 0,164$ )	0,469 (<0,01)	0,64
Parque Lenin	26	1,67( $\pm 0,82$ )	0,019 ( $\pm 0,045$ )	0,087( $\pm 0,104$ )	0,786 (<0,01)	0,88
Río Arimao	13	1,83( $\pm 0,75$ )	0,249 ( $\pm 0,259$ )	0,239( $\pm 0,267$ )	0,038 (NS)	0,08
Río Hondo	15	1,50( $\pm 0,84$ )	0,025 ( $\pm 0,039$ )	0,092( $\pm 0,191$ )	0,733 (<0,01)	0,85
Río Manaquita	15	1,50( $\pm 0,84$ )	0,028 ( $\pm 0,044$ )	0,149( $\pm 0,25$ )	0,814 (<0,01)	0,90
Río Yayabo	20	1,33( $\pm 0,52$ )	0,01 ( $\pm 0,025$ )	0,174( $\pm 0,27$ )	0,940 (<0,01)	0,97
Tío Pancho	22	1,17( $\pm 0,41$ )	0,008 ( $\pm 0,019$ )	0,008( $\pm 0,02$ )	0 (NS)	1,00
Vaquería 7	13	1,33( $\pm 0,52$ )	0,031 ( $\pm 0,049$ )	0,101( $\pm 0,212$ )	0,689 (<0,05)	0,82
Vegas Grandes	10	1,33( $\pm 0,52$ )	0,05 ( $\pm 0,083$ )	0,117( $\pm 0,24$ )	0,571 (NS)	0,73
Arroyo	16	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
Puesto de Mando	6	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
El Antojo	6	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
'El Azufre	19	1,17( $\pm 0,41$ )	0	0,076( $\pm 0,186$ )	1 (<0,01)	1,00
Guillén-Boca	15	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
Río Central	7	1,50( $\pm 0,84$ )	0,048 ( $\pm 0,073$ )	0,091( $\pm 0,163$ )	0,478 (NS)	0,65
Matadero de Aves	24	1,50( $\pm 0,84$ )	0,007 ( $\pm 0,017$ )	0,17( $\pm 0,263$ )	0,959 (<0,01)	0,98
Pilón	6	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
San Juan y Martínez	14	1,17( $\pm 0,41$ )	0	0,024( $\pm 0,058$ )	1 (NS)	1,00

r : populations de *P. columella* résistantes à l'infection par *F. hepatica*

Le  $F_{ST}$  global est de 0,339 (p = 0,203). Le tableau 2.12 montre les valeurs  $F_{ST}$  par paires de populations. Les populations qui sont significativement différenciées de la plupart des autres sont les populations résistantes à *F. hepatica* (La Coca, Babiney et El Azufre). Ces populations résistantes sont non seulement différencierées de populations sensibles, mais également entre elles. Seule la population susceptible (Matadero Aves) est différente de cinq autres populations susceptibles.

**Tableau 2.12.** Estimations de la différenciation génétique entre paires de populations (valeurs  $F_{ST}$ ) chez *Pseudosuccinea columella* (populations : LC = La Coca, BA = BabineY, PL = Parque Lenín, RA = Río Arimao, RH = Río Hondo, RM = Río Manaquita, RY = Río Yayabo, TP = Tío Pancho, V7 = Vaquería 7, VG = Vegas Grandes, AR = Arroyo, PM = Puesto de Mando, AN = El Antojo, AZ = El Azufre, GB = Guillén-Boca, RC = Río Central, MA = Matadero Aves, PI = Pilón, SJM = San Juan y Martínez).

	'LC	'BA	IPA	PL	RA	RH	RM	RY	TP	V7	VG	AR	PM	AN	'AZ	GB	RC	MA	PI	SJM
'LC	0,000																			
'BA	0,452*	0,000																		
IPA	0,548*	0,694*	0,000																	
PL	0,598*	0,730*	0,001	0,000																
RA	0,321*	0,564	0,187	0,301	0,000															
RH	0,560	0,693	0,045	0,009	0,272	0,000														
RM	0,501*	0,664*	0,108	0,222	0,095	0,221	0,000													
RY	0,548*	0,697*	0,248	0,338	0,289	0,307	0,294	0,000												
TP	0,616*	0,748*	0,010	-0,023	0,344	0,149	0,271	0,353	0,000											
V7	0,524*	0,686*	0,020	0,120	0,141	0,168	-0,039	0,283	0,167	0,000										
VG	0,497	0,6664	0,072	0,209	0,105	0,250	-0,107	0,272	0,314	-0,116	0,000									
AR	0,623*	0,771*	0,090	0,033	0,460	0,161	0,432	0,440	-0,007	0,386	0,587	0,000								
PM	0,552*	0,709*	0,006	-0,037	0,310	0,054	0,281	0,318	-0,041	0,224	0,385	NA	0,000							
AN	0,552*	0,709*	0,006	-0,037	0,310	0,054	0,281	0,318	-0,041	0,224	0,385	NA	0,000							
'AZ	0,301	0,590*	0,856*	0,871*	0,742*	0,862	0,842*	0,823*	0,934*	0,872*	0,873	0,932*	0,905*	0,905*	0,000					
GB	0,617*	0,766*	0,085	0,029	0,449	0,153	0,421	0,431	-0,008	0,374	0,573	NA	NA	0,930*	0,000					
RC	0,521*	0,685*	-0,036	-0,004	0,203	0,046	0,163	0,152	-0,017	0,084	0,154	0,022	0,022	0,870*	0,144	0,000				
MA	0,560*	0,703*	0,180*	0,253	0,280*	0,234	0,266*	-0,028	0,250	0,230*	0,235*	0,320	0,220	0,812*	0,313	0,082	0,000			
PI	0,552*	0,709*	0,006	-0,037	0,310	0,054	0,281	0,318	-0,041	0,224	0,385	NA	NA	0,905*	NA	0,022	0,220	0,000		
SJM	0,597*	0,748*	0,071	0,028	0,385	0,111	0,362	0,396	0,017	0,295	0,448	0,010	-0,075	0,912*	0,005	0,074	0,291	-0,075	0,000	

\*différenciation significative après la correction de Bonferroni (valeur ajustée de  $P = 0,0000263$ ).<sup>a</sup>populations résistantes de *Pseudosuccinea columella*

Au niveau du génotypage multilocus (incluant les six loci microsatellites), on a trouvé 36 GTML différents (tableau 2.13). Le nombre moyen de GTML est de 2,764 ( $\pm 1,562$  SD) pour les populations susceptibles et de 6,333 ( $\pm 3,785$  SD) pour les populations résistantes ; la différence est statistiquement significative (valeur *t*-Student 2,93 ;  $P = 0,008$ ). Parmi les 18 GTML observés chez les individus résistants, deux seulement (*E* et *F*) sont partagés entre deux populations résistantes (El Azufre et La Coca). Le GTML *Y* est le plus fréquent et le plus répandu à Cuba ; il est le seul affiché dans les populations monomorphes. Par ailleurs, il faut souligner que les individus trouvés infectés par *F. hepatica* à Pilón et IPA sont de génotype multilocus *Y*. Le GTML *T* a été trouvé seulement dans les populations les plus orientales (Río Manaquita, Río Central et Matadero Aves). Il est à noter que ce même génotype *T* se retrouve dans différents endroits du monde et est considéré comme invasif (Lounnas *et al.*, soumis : article No. 7).

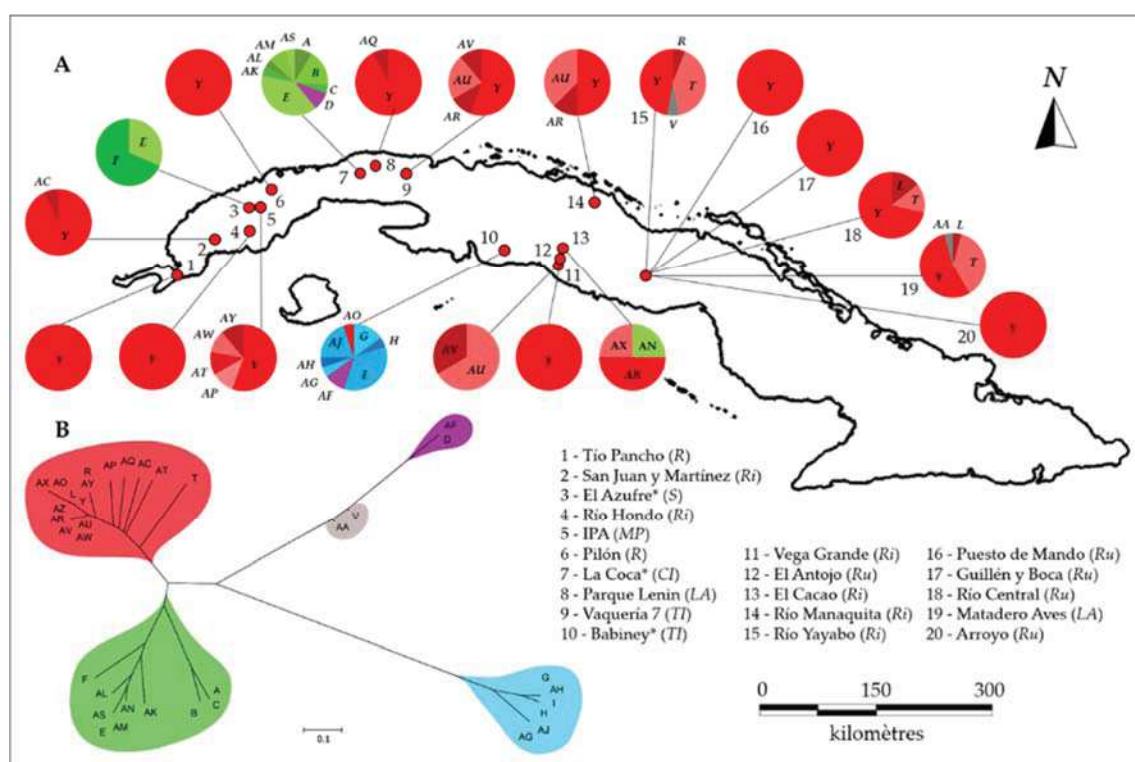
Tous les GTML restants peuvent être considérés comme rares et diffèrent les uns des autres par des changements à un ou quelques loci (figure 2.14B).

**Tableau 2.13.** Tailles d'échantillons (N) et géotypes multilocus (GTML) pour 20 populations de *Pseudosuccinea columella* à Cuba.

Population	N (nombre de GTML différents)	Nom du GTML (nombre d'individus)
Tío Pancho	4 (1)	<i>Y</i> (4)
San Juan y Martínez	14 (2)	<i>Y</i> (13), <i>AC</i> (1)
'El Azufre	19 (2)	<i>E</i> (6), <i>F</i> (13)
Río Hondo	2 (1)	<i>Y</i> (2)
IPA	9 (5)	<i>Y</i> (5), <i>AP</i> (1), <i>AT</i> (1), <i>AW</i> (1), <i>AY</i> (1), <i>AZ</i> (1)
Pilón	6 (6)	<i>Y</i> (6)
'La Coca	23 (9)	<i>A</i> (2), <i>B</i> (4), <i>C</i> (1), <i>D</i> (2), <i>E</i> (9), <i>AK</i> (1), <i>AL</i> (1), <i>AM</i> (2), <i>AS</i> (1)
Parque Lenin	13 (2)	<i>Y</i> (12), <i>AQ</i> (1)
Vaquería 7	9 (4)	<i>Y</i> (5), <i>AR</i> (1), <i>AU</i> (2), <i>AV</i> (1)
'Babiney	20 (8)	<i>G</i> (3), <i>H</i> (1), <i>I</i> (7), <i>AF</i> (2), <i>AG</i> (1), <i>AH</i> (1), <i>AJ</i> (4), <i>AO</i> (1)
Vegas Grandes	3 (2)	<i>AU</i> (2), <i>AV</i> (1)
El Antojo	10 (4)	<i>Y</i> (6), <i>AN</i> (1), <i>AR</i> (2), <i>AX</i> (1)
Río Arimao	4 (3)	<i>AN</i> (1), <i>AR</i> (2), <i>AX</i> (1)
Río Manaquita	8 (3)	<i>Y</i> (4), <i>AR</i> (1), <i>AU</i> (3)
Río Yayabo	17 (4)	<i>R</i> (1), <i>T</i> (7), <i>V</i> (1), <i>Y</i> (8)
Puesto de Mando	6 (1)	<i>Y</i> (6)
Guillén-Boca	15 (1)	<i>Y</i> (15)
Río Central	7 (3)	<i>L</i> (1), <i>T</i> (1), <i>Y</i> (5)
Matadero de Aves	16 (4)	<i>L</i> (1), <i>T</i> (1), <i>Y</i> (13), <i>AA</i> (1)
Arroyo	16 (1)	<i>Y</i> (16)

les populations marquées ' correspondent à des *P. columella* résistantes

La figure 2.14A montre la distribution des 36 GTML observés dans les 20 populations de *P. columella* à Cuba. On peut noter que le GTML Y est présent dans la plupart des populations de l'Ouest à l'Est et est absent des populations résistantes, ainsi que de deux populations susceptibles (Vegas Grandes et Río Arimao). Le réseau de GTML formé à partir des distances génétiques (Nei) n'a réussi à former que trois groupes majoritaires et deux petites associations de deux GTML chacune (figure 2.14B). Tous les GTML des individus susceptibles se regroupent dans deux clusters (rouge et gris sur la figure 2.14), dont un comprenant la majorité des GTML (rouge). Deux des grands clusters (vert et bleu) et un petit (violet ; figure 2.14) regroupent les GTML des individus résistants. Il est à noter qu'un GTML (AN) trouvé dans la population sensible de Río Arimao est proche des GTML présents dans les populations résistantes de El Azufre et La Coca (cluster vert sur la figure 2.14).



**Figure 2.14.** Génotypes multilocus (GTML) à partir de 6 loci de microsatellites chez la limnée *Pseudosuccinea columella*. A = Distribution géographique à Cuba des différents GTML par population. B = Réseau formé en utilisant la méthode UPGMA à partir des distances génétiques (Nei) de chaque GTML (les couleurs différentes correspondent à des clusters différents). TI = terrain inondé, R = rizière, Ru = Ruisseau, LA = lac artificiel, Ri = rivière, MP = mare permanente, CI = canal d'irrigation, S = source.

### 2.4.3. Discussion

#### 2.4.3.1. Génétique des populations de *Galba cubensis* et sa relation avec la transmission de *Fasciola hepatica* à Cuba

##### Article 6 : en préparation

##### Ancient versus recent invasion: two genetic signatures in colonization history of a freshwater selfing snail *Galba cubensis-neotropica*

M. Lounnas, P. Alda, A.A. Vázquez, A. Gutiérrez, M. Yong, J. Sánchez, A.O. Narváez, J. Muzzio, V. Macias, L. Martini, O. Noya, C. Visnivesky-Colli, L. Prepelitchi, R. Ayaqui, J. Arenas, E.S. Loker, P. David, P. Jarne, J.-P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès

La transmission de *F. hepatica* par *G. cubensis* dans le monde est circonscrite à la région néotropicale et probablement à la portion Sud de la région néarctique (Cruz-Reyez et Malek, 1987 ; Correa *et al.* 2011 ; Lounnas *et al.* soumis : article No. 6). Plusieurs sites de transmission dans lesquels la présence de *G. cubensis* a été confirmée sont documentés aux Etats Unis (Kaplan *et al.* 1997) et à Cuba (Ferrer *et al.* 1985 ; cet étude, voir résultats 3.1), ainsi qu'en l'Amérique du Sud (Pointier *et al.* 2009). Seule la génétique des populations peut aider à éclairer les patterns de diversité génétique en relation avec la circulation des souches de douve dans chaque région.

La faible diversité allélique par population, ainsi que les très forts écarts à la panmixie chez cette limnée suggèrent un régime de reproduction très autofécondant (moyenne du taux d'autofécondation :  $0,911 \pm 0,11$  SD) – sachant que les échantillonnages ont été réalisés sur de très faibles surfaces, on peut a priori exclure un effet Wahlund-. Au moins deux autres limnées du groupe *Galba* sont déjà connues pour une préférence à l'autofécondation (*G. truncatula* : Meunier *et al.* 2004a ; *G. schirazensis* : Correa, 2010), de même que d'autres lymnéidés (*P. columella* : Nicot *et al.* 2008, Correa, 2010, cette étude ; *Omphiscola glabra* : Hurtrez-Boussès *et al.* 2006).

Bien que *G. cubensis* ait été décrite pour la première fois à Cuba (Pfeiffer, 1835), rien ne dit que cette localité type coïncide avec l'aire d'origine de cette espèce. En revanche, il est raisonnable de penser à une histoire évolutive suffisamment ancienne sur l'île, qui permettrait d'expliquer la diversité génétique trouvée (27 GTML différents pour 12 populations). Les valeurs de  $F_{ST}$  montrent une nette différenciation entre la plupart des populations, qui pourrait être expliquée soit par une divergence entre populations à

partir d'un événement d'introduction unique, soit par plusieurs événements d'introduction indépendants. En cas d'introductions répétées, on s'attendrait à observer des GTML très différents les uns des autres et une diversité génétique intra-population d'autant plus faible que la date d'introduction est récente (Roman et Darling, 2007). Au contraire, le fait qu'il y ait très peu de populations entièrement monomorphes et la ressemblance entre la plupart des GTML (qui diffèrent les uns des autres à un ou quelques loci) seraient plutôt en faveur d'une diversification progressive à partir d'une (ou quelques) souche(s) arrivée(s) anciennement (plus de 180 ans) à Cuba. En effet, à partir de la population d'origine, une augmentation du nombre d'allèles différents à chaque locus peut se produire par mutations (Roman et Darling, 2007). De plus, l'isolement par la distance que nous observons (les populations se ressemblent d'autant plus qu'elles sont géographiquement proches) est en faveur d'une colonisation de l'île par *G. cubensis*, de proche en proche, à partir d'une population source introduite initialement.

Le fait qu'il n'y ait pas de différenciation significative entre les populations de zones touchées par la fasciolose mériterait d'être approfondi par des études complémentaires. Il faudrait en effet déterminer s'il s'agit d'un seul hasard (d'autant que les populations sont relativement proches géographiquement) ou s'il existe, dans ces populations, des génotypes plus sensibles à l'infection ou plus compatibles avec les souches de douves qui circulent.

*2.4.3.2. Diversité génétique, pattern de distribution des populations susceptibles et résistantes de Pseudosuccinea columella à Cuba et liens avec les risques de transmission de la fasciolose.*

#### **Article 7 : re-soumis à *Molecular Ecology***

#### **Clone invasion as a health threat: the case of *Pseudosuccinea columella* vector of fasciolosis**

M. Lounnas, A.C. Correa, A.A. Vázquez, A. Dia, J.-P. Pointier, A. Nicot, J.S. Escobar, P. David, P. Jarne, J. Arenas, R. Ayaqui, M.P. Dubois, T. Gimenez, A. Gutiérrez, C. González-Ramírez, E.S. Loker, O. Noya, L. Prepelitchi, J. Sánchez, N. Uribe, C. Visnivesky-Colli, M. Yong, S. Hurtrez-Boussès

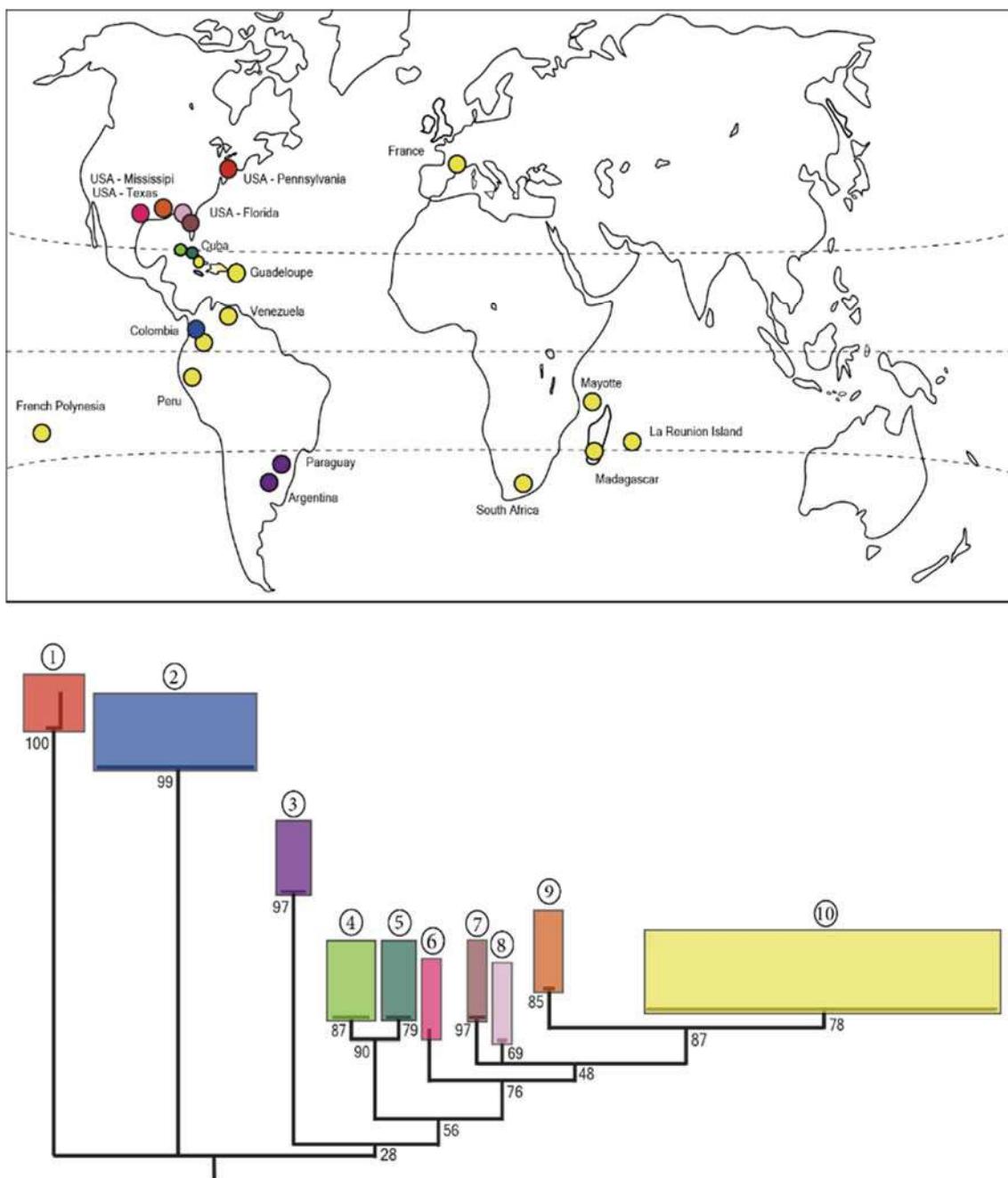
Notre étude montre les mêmes patterns que ceux déjà décrits par des travaux sur la même espèce : une très faible diversité et de très forts écarts à la panmixie, cohérents avec la prédominance de l'autofécondation (Nicot *et al.* 2008 ; Lounnas *et al.*, soumis : article No. 7). En revanche, trois populations (IPA, Río Central et surtout Río Arimao) ont montré des valeurs très faibles du taux d'autofécondation. Plusieurs travaux ont montré que la fécondation croisée représente un avantage dans les populations soumises à de fortes pressions parasitaires (Lively, 1987 ; Agrawal et Lively, 2001). Inversement, l'autofécondation peut être sélectionnée dans des milieux imprévisibles et très variables (Baker, 1967), assurant la reproduction même si un seul individu survit ou vient recoloniser le milieu. On attendrait donc des taux d'autofécondation plus faibles dans des milieux plus stables et/ou dans des endroits soumis à de plus fortes pressions parasitaires. La localité IPA a été antérieurement signalée comme une zone très probable de fasciolose (Gutiérrez *et al.* 2005b). IPA est une des deux seules localités où des individus infestés ont été trouvés sur le terrain (voir résultats 3.1.2) et correspond à une mare permanente peu variable pendant l'année car il s'agit d'un écosystème fermé et adapté pour stocker l'eau. Les deux autres sites, Río Central et Río Arimao sont reconnus comme des sites actifs de transmission de la douve (IMV, 2013) et correspondent à des rivières de taille moyenne qui ne souffrent pas de modifications significatives à chaque saison.

Contrairement à ce que nous avons montré pour *G. cubensis*, on observe peu de différenciation entre populations, sauf pour les populations résistantes à la douve qui sont clairement différencierées des autres. Ceci est en accord avec des travaux précédents qui montraient que ces populations résistantes sont génétiquement différencierées des sensibles (Fernández-Caliénas *et al.* 2004). En effet, Gutiérrez *et al.* (2003) avaient détecté pour ces populations des profils nettement différents de RAPD en utilisant 17 amorces.

On a trouvé chez *P. columella* sept populations entièrement monomorphes et un génotype multilocus (*Y*) prédominant, présent dans 15 des 20 populations étudiées. Cette très faible diversité génétique peut être expliquée par un goulot d'étranglement très récent, qui serait dû à l'introduction de cette souche sur l'île, suivie d'une rapide expansion dans différents sites. Un cas similaire a été documenté chez *G. truncatula* sur

l'Altiplano Bolivien (Meunier *et al.* 2001). De plus, une analyse des populations de *P. columella* à l'échelle mondiale (Lounnas *et al.*, soumis : article No. 7) montre de la même façon l'existence d'un génotype multilocus invasif (*T* ; figure 3.15), qui se retrouve seul dans des populations très distantes (Colombie, Pérou, Venezuela, Antilles, Afrique du Sud, îles de l'Océan Indien). Ce génotype invasif mondial est également présent à Cuba, uniquement dans deux populations (Río Central et Matadero de Aves). En revanche, notre étude montre que deux (La Coca et Babiney) des trois populations résistantes à la fasciolose ont une diversité allélique plus importante que toutes les autres populations étudiées. La troisième population résistante (El Azufre) est localisée dans une petite source isolée, et est probablement soumise à des goulots d'étranglement plus fréquents que les deux autres qui sont dans des terrains inondables beaucoup plus vastes et stables.

Dans l'étude de Lounnas *et al.* (soumis : article No. 7), nous avons combiné l'analyse des marqueurs microsatellites (fortement variables) à celle de marqueurs mitochondriaux conservés (COI et 16S). Il en ressort qu'on trouve dans les populations cubaines trois haplotypes différents (sur 10 enregistrés dans l'ensemble des populations étudiées par le monde) (Figure 3.15). Un de ces haplotypes (n°10) se retrouve dans la plupart des populations échantillonnées dans le monde et comprend les populations invasives (GTML *T*). On peut donc penser que cet haplotype aurait été introduit assez récemment à Cuba et que les loci microsatellites ont eu le temps de diverger légèrement depuis. Parmi les génotypes présents dans cet haplotype, un (*Y*) semble avoir un fort potentiel invasif et avoir colonisé très récemment plusieurs sites de Cuba (plusieurs populations entièrement monomorphes pour ce GTML). Enfin, il n'est pas impossible que le GTML *T*, qui se répand très rapidement à travers la planète, soit arrivé tout dernièrement dans quelques sites à Cuba. Un suivi temporel de la composition génétique de ces populations permettra de savoir s'il supplante les autres génotypes ou pas. Les deux autres haplotypes (n° 4 et 5- figure 3.15) sont rassemblés dans un cluster différent. L'haplotype n°5 correspond aux populations résistantes à la fasciolose, ce qui confirme qu'elles sont génétiquement différentes des populations sensibles. Le fait qu'elles ne montrent qu'un seul haplotype mitochondrial peut être interprété comme l'acquisition relativement récente et unique de cette résistance (à partir d'un haplotype ancêtre commun aux haplotypes 4 et 5 qui aurait déjà été présent à Cuba).



**Figure 3.15.** Réseau de Maximum likelihood de trois gènes concaténés, 16S et CO1, dans 79 individus de *Pseudosuccinea columella*. Dix clusters sont représentés par différentes couleurs correspondant aux cercles dans la carte. Cluster 1 (rouge) : USA – Pennsylvanie; Cluster 2 (bleu) : Colombie; Cluster 3 (violet) : Argentine et Paraguay; Cluster 4 (vert clair) : Cuba; Cluster 5 (vert) Cuba- individus résistants à *Fasciola hepatica*; Cluster 6 (rosé) : USA – Texas; Cluster 7 (brun) : USA – sud de la Floride; Cluster 8 (rosé clair) : USA – Floride ; Cluster 9 (orange) : USA – Mississippi ; et Cluster 10 (jaune) : Colombie, Cuba, Guadeloupe, Venezuela, Pérou, Polynésie Française, Afrique du Sud, Madagascar, Mayotte, La Réunion, France et USA. Figure dans Lounnas et al. soumis à Molecular Ecology, article No. 7.

L'introduction de *P. columella* dans le monde est connue pour se produire à partir d'évènements aléatoires comme les inondations, la dissémination par des oiseaux aquatiques ou les activités humaines (par exemple le commerce de plantes aquatiques) (Madsen et Frandsen, 1989 ; Pointier *et al.* 2007). La date d'introduction de *P. columella* à Cuba est inconnue, mais cette espèce a été décrite à Cuba en 1858 sous le nom de *Lymnaea francisca* (Poey). On peut donc raisonnablement penser à une première introduction au début 19ème siècle. On peut donc supposer que ce premier événement d'introduction à Cuba aurait apporté les individus ancêtres des haplotypes 4 et 5 ; à partir de cette souche, serait apparue la résistance (haplotype 5). Compte-tenu du coût à la résistance (Gutiérrez *et al.* 2005a), celle-ci se maintiendrait sous la pression exercée par la douve. Les premières descriptions de fasciolose humaine à Cuba datent de 1930 (Kourí et Arenas, 1931). Même si la douve pouvait déjà circuler dans les troupeaux auparavant, cette période pourrait correspondre à une intensification de la fasciolose à Cuba. Le parasite aurait pu exercer à partir de ce moment-là une pression suffisante sur les populations de mollusques pour sélectionner des individus résistants. Une introduction beaucoup plus récente de *P. columella* (haplotype 10) se serait produite à l'Ouest ou au centre de l'île (voir résultats 2.2.2.1), et une souche majeure (GTML Y) se serait répandue très rapidement.

Les introductions de vecteurs sont très problématiques pour les risques épidémiologiques. En effet, d'une part les populations récemment introduites ont une diversité génétique réduite et donc ont peu de chances de comporter des individus résistants au parasite. D'autre part certaines populations sont invasives, colonisant très vite un grand nombre de sites. Si on admet un coût à la résistance (comme proposé par Gutiérrez *et al.* 2005a), il est peu probable que les génotypes ayant de grandes aptitudes de colonisateurs soient en même temps résistants au parasite. On peut donc penser que la capacité d'invasion de *P. columella* représente un vrai danger pour la propagation de la grande douve du foie. La capacité de transmettre la douve du foie par des populations de *P. columella* introduites dans le monde a été confirmée au Brésil et en Argentine (Marques *et al.* 2006 ; Zarco *et al.* 2011), en Egypte (Grabner *et al.* 2014) et en Australie (Molloy et Anderson, 2006). De même, la transmission de *F. hepatica* par cette espèce est présumée en Afrique du Sud (Kock *et al.* 2003) et dans les îles du Pacifique où elle a été aussi introduite, incluant Hawaï (Cowie, 2001 ; Pointier et Marquet, 1990). Il est donc

important de continuer à surveiller de près les populations de *P. columella* en différents endroits du monde.

Finalement, pour conclure ce chapitre sur la biologie des populations de limnées cubaines, on a affaire à deux vecteurs de la fasciolose qui ont une histoire évolutive et une écologie bien différentes. Les données malacologiques suggèrent que les deux mollusques seraient présents à Cuba depuis un peu plus de deux siècles environ. Malgré ce temps d'occupation similaire et un système de reproduction comparable (autofécondation majoritaire) la structure de leurs populations est différente. Nos résultats suggèrent en effet que les populations de *G. cubensis* auraient peu à peu divergé et se seraient légèrement diversifiées au cours du temps et de leur dissémination. En raison de son amphibiase, *G. cubensis* semble moins sensible que *P. columella* aux variations du milieu (assèchements) et aux perturbations causées par l'Homme. Les populations de cette espèce semblent donc plus stables. Le pattern est différent chez *P. columella*, où la diversité intra-population très faible témoigne de goulots d'étranglement plus fréquents (milieux plus instables) et d'événements d'introduction récents. On a donc probablement pour cette espèce un mélange entre populations introduites récemment et populations issues d'une occupation ancienne, au sein desquelles des variants résistants à la douve ont pu être sélectionnés. Si on envisage que la douve serait arrivée sur l'île peu de temps après les limnées, on peut penser que la plupart des populations de *G. cubensis* ont entamé à ce moment-là une coévolution avec la douve. Chez *P. columella*, on aurait en revanche un mélange entre populations qui ont aussi une histoire co-évolutive assez longue avec la douve et populations nouvellement arrivées qui n'ont pas connu la même histoire.

On arrive là aux limites de l'approche de terrain. En effet, bien qu'une population de limnées puisse être infectée avec *F. hepatica*, trouver les individus infectés reste très difficile à cause de leur écologie (Ciparis *et al* 2013 ; Jokela et Lively, 1995) (pour des résultats considérant les limnées cubaines voir résultats 3.1.2). Il est donc difficile de tester si ce sont toujours les mêmes génotypes de mollusques qui sont responsables de la transmission. Un échantillonnage exhaustif dans d'autres aires de fasciolose, à Cuba ou dans d'autres régions du monde peut aider à avancer, mais on ne peut pas en parallèle se passer d'une approche expérimentale.

## Chapitre 3 : Compatibilité dans le système *Fasciola hepatica* / limnées à Cuba

### 3.1 Infections naturelles des différentes populations de limnées

**Article 8 : Parasitology Research (2015) 114: 4205-4210**

**Natural prevalence in Cuban populations of the lymnaeid snail *Galba cubensis* infected with the liver fluke *Fasciola hepatica*: small values do matter**

A.A. Vázquez, J. Sánchez, A. Alba, J.-P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès

Les infections naturelles de mollusques sont un des sujets les plus intéressants pour les parasitologues et les malacologistes qui veulent étudier la dynamique des maladies infectieuses transmises par ces hôtes intermédiaires (Cichy *et al.* 2011). La recherche de larves de parasites dans les mollusques a révélé une très grande diversité de digènes qui peuvent infecter ces hôtes et a permis donc d'augmenter les connaissances sur maladies transmises par ces hôtes (Zbikowska et Nowak, 2009). Les études des prévalences naturelles permettent de connaître les pics d'infestation dans les populations et d'identifier les espèces d'hôtes particulières pour certains parasites (Gürelli et Göçmen, 2007 ; Mage *et al.* 2002).

Dans le cas de la transmission de fasciolose, ces parasites sont connus pour être transmis par une grande variété d'espèces de limnées (Correa *et al.* 2010), mais les patterns d'infection peuvent différer selon l'espèce hôte et les conditions environnementales (Cruz-Mendoza *et al.* 2004). Des études ont été réalisées dans la région du centre de la France chez l'espèce *G. truncatula*. Ces études ont montré une stabilité d'infection par *F. hepatica* sur le terrain (Mage *et al.* 2002). En même temps, une étude réalisée sur l'espèce *Omphiscola glabra* dans la même région montre une augmentation des prévalences au cours d'une période de six ans (Dreyfuss *et al.* 2003). Il a été montré ensuite qu'il s'agit d'un événement de transfert de la douve vers un nouvel hôte, *O. glabra* (Correa, 2010). Plus largement, ce type d'étude a permis de caractériser le très large spectre d'hôtes de *F. hepatica*. Parmi les exemples les plus frappants, on peut citer les travaux de Hamed *et al.* (2009) chez l'espèce de Planorbidae

*Bulinus truncatus*, qui a été trouvée infectée avec une prévalence de 39% au nord de la Tunisie. De même, Relf *et al.* (2009) ont décrit 73.9% de prévalence chez le mollusque terrestre *Omalonyx matheroni* (Succinidae).

Alors que la situation de la fasciolose est très préoccupante à Cuba, paradoxalement, aucune étude sur les prévalences naturelles n'avait jamais été réalisée. Ce point est pourtant indispensable pour étudier les relations entre *F. hepatica* et les espèces de limnées. Bien que des individus de *G. cubensis* aient été observés infectés sur le terrain, surtout après les épidémies de fasciolose (Ferrer *et al.* 1985), des études systématiques considérant la prévalence et l'intensité d'infection restaient à faire. Ici, nous présentons les premiers résultats d'infections naturelles chez les deux espèces, *G. cubensis* et *P. columella*, dans différentes régions de Cuba. On discute aussi de la relation entre prévalences naturelles et risques de transmission de *F. hepatica*.

### 3.1.1. Matériels et Méthodes

L'échantillonnage des limnées a été réalisé dans la région occidentale de Cuba, en considérant qu'il s'agit de la région la plus fortement affectée par la fasciolose humaine (Rojas *et al.* 2010). Onze sites avec différents types d'habitats ont été échantillonnés (tableau 3.1) dans différentes localités à Cuba. Toutes les localités sont répertoriées comme des zones à fasciolose par les autorités vétérinaires de chaque municipalité. Les limnées collectées ont été rapportées vivantes au laboratoire pour leur identification et la vérification de l'infection. Dans le cas de l'espèce *P. columella*, les individus ont été séparés en résistants et susceptibles d'après les marqueurs phénotypiques décrits par Gutiérrez *et al.* (2003b). Tous les échantillonnages ont été réalisés entre janvier et mars 2013 pendant la saison sèche, qui correspond au pic de contamination des hôtes définitifs. Les espèces d'hôtes définitifs domestiques observées sont la vache (*Bos taurus*) et le buffle (*Bubalus bubalis*). Les individus de ces espèces d'hôtes sont connus pour se déplacer librement au sein des localités étudiées. Dans chacune des localités, on a vérifié l'infection des bovins par examen systématique des foies aux abattoirs : les prévalences dépassaient les 70% (voir résultats du chapitre 1).

Tous les individus échantillonnés ont été disséqués sous la loupe binoculaire en cherchant des stades larvaires de trématodes (réries et cercaires). Le nombre de réries a été compté afin de déterminer l'intensité parasitaire. Dans chaque localité, la

prévalence, ainsi que l'intensité et l'abondance moyennes (Bush *et al.* 1997) ont été examinées. La présence d'autres espèces de trématodes a aussi été enregistrée pour les deux espèces de limnées. L'identification de ces larves a été faite en utilisant la clé de Frandsen et Christensen (1984) et Rondelaud *et al.* (2009).

**Tableau 3.1.** Localités et types d'écosystèmes pour les limnées échantillonnées dans la région occidentale de Cuba pour étudier le taux d'infection naturel par *F. hepatica*.

Localité	Site	Coordonnées GPS	Habitat	Espèce de limnée	Espèce hôte définitif
Havane	La Coca	22,957° N; -82,464° O	canaux d'irrigation	<i>G. cubensis</i> <i>P. columella</i>	Vache
Jaruco	CPA	23,078° N; -81,917° O	pâturage inondable	<i>G. cubensis</i> <i>P. columella</i>	Buffle
La Palma	IPA	22,664° N; -83,558° O	mare permanente	<i>P. columella</i>	Vache
La Palma	El Pilón	22,846° N; -83,359° O	rizières	<i>P. columella</i>	Vache
La Palma	Vaquería 108	22,558° N; -83,367° O	pâturage inondable	<i>G. cubensis</i>	Vache
La Palma	Vaquería 122	22,544° N; -83,354° O	pâturage inondable	<i>G. cubensis</i>	Vache
La Palma	Vaquería 127	22,568° N; -83,376° O	pâturage inondable	<i>G. cubensis</i>	Vache
La Palma	Vaquería 131	22,594° N; -83,372° O	pâturage inondable	<i>G. cubensis</i>	Vache
Artemisa	Vaquería 503	22,731° N; -82,659° O	pâturage inondable	<i>G. cubensis</i>	Buffle
Artemisa	Vaquería 505	22,731° N; -82,659° O	pâturage inondable	<i>G. cubensis</i>	Buffle
Sandino	Los Modesto	21,978° N ; -84,263° O	rizières	<i>P. columella</i>	Vache

### 3.1.2 Résultats

Trois types de cercaires ont été trouvés chez les mollusques disséqués : (1) cercaires avec une queue simple, longue et blanche du type *Gymnocephalous cercariae* avec la ventouse ventrale dans la région centrale du corps (*F. hepatica*), (2) cercaires de petite taille, marron, du type *Amphistome cercariae* (Paramphistomatidae), et (3) petites cercaires brévirquées (Schistosomatidae). Les cercaires identifiées comme *F. hepatica* ont été observées avec des rédies montrant un pharynx bien développé, un collet d'anneaux et deux appendices dans la région postérieure caractéristiques de cette espèce.

Le tableau 3.2 résume les données d'infection naturelle chez les deux espèces de limnées. La prévalence moyenne de *F. hepatica* a été de 2,94% chez *G. cubensis*, avec des variations importantes entre populations (min : 0%, max : 11,4%). On n'a trouvé aucun cas de co-infection entre *F. hepatica* et d'autres espèces de trématodes dans le même individu. Il faut noter que l'espèce *P. columella* a été trouvée infectée dans deux localités pour la première fois à Cuba. Les prévalences sont de 2% (IPA) et 3% (Pilón).

**Tableau 3.2.** Prévalence naturelle, intensité et abondance moyennes chez les deux espèces limnées à Cuba infectées avec *F. hepatica* et infection par d'autres familles de trématodes.

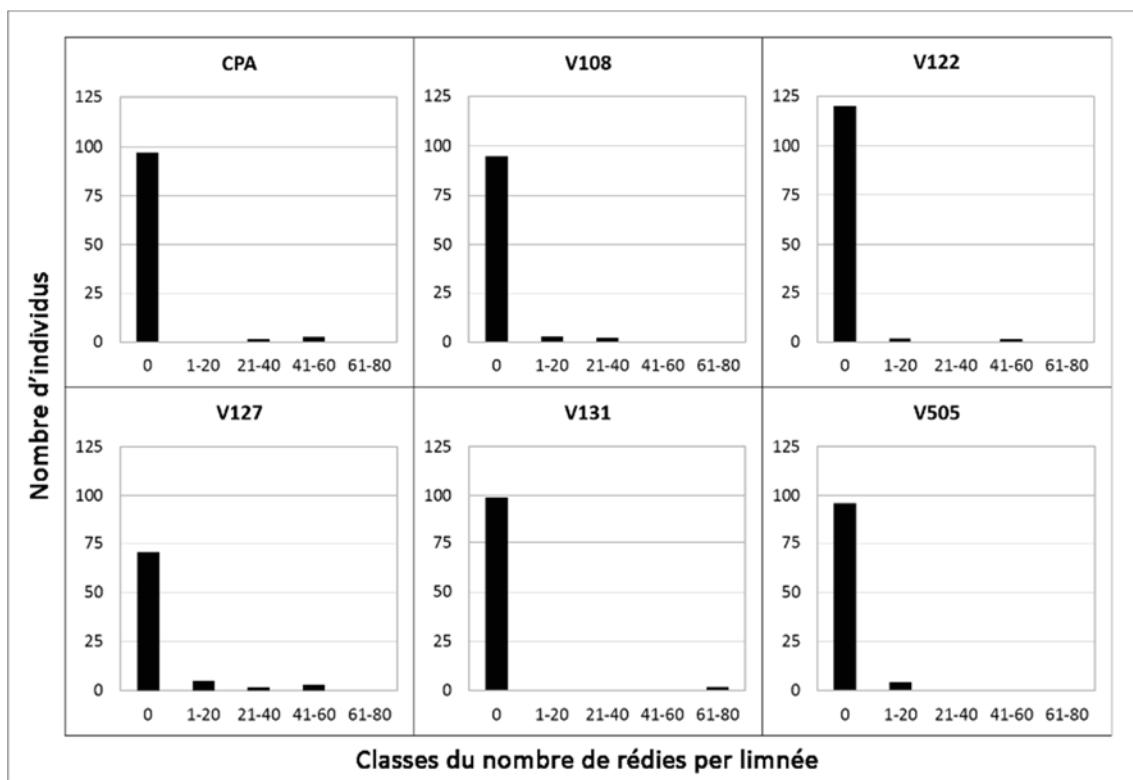
N = nombre de mollusques examinés

n= nombre d'individus parasités par *F. hepatica* (% = prévalence)

nt = nombre d'individus infectés par un autre Digène

Site	N	n (%)	Infection par d'autres digènes (nt)	Intensité moyenne ( $\pm$ SD)	Abondance moyenne ( $\pm$ SD)
<i>Galba cubensis</i>					
La Coca	135	0	Schistosomatidae (1)	-	-
CPA	100	3 (3)	-	35,67 ( $\pm$ 11,93)	1,07 ( $\pm$ 6,35)
V108	100	5 (5)	Schistosomatidae (1)	16,60 ( $\pm$ 13,05)	0,83 ( $\pm$ 4,48)
V122	122	2 (1,64)	-	26 ( $\pm$ 24,04)	0,43 ( $\pm$ 3,97)
V127	79	9 (11,39)	-	26,11 ( $\pm$ 19,29)	2,97 ( $\pm$ 10,39)
V131	100	1 (1)	Paramphistomatidae (3)	76	0,76 ( $\pm$ 7,6)
V503	80	0	Paramphistomatidae (2)	-	-
V505	100	4 (4)	-	6,06 ( $\pm$ 7)	0,28 ( $\pm$ 1,74)
Total	816	24 (2,94)		24,21 ( $\pm$ 20,02)	0,71 ( $\pm$ 5,3)
<i>Pseudosuccinea columella</i>					
Pilón	100	3 (3)	-	-	-
La Coca	100	0	-	-	-
IPA	100	2 (2)	-	-	-
Total	300	5 (1,66)			

Dans chacune des populations de *G. cubensis*, on observe une distribution de *F. hepatica* fortement agrégée (figure 3.1) : la plupart des individus sont sains et un petit nombre d'individus possède une grande quantité de rédies. L'intensité de l'infection par *F. hepatica* varie entre 1 et 76 rédies par mollusque hôte. L'individu qui portait 76 rédies était le seul infecté dans sa population (V131), sur un échantillon de 100. De même, pour la population V122, seulement deux individus sur 122 étaient infectés, avec des intensités respectives de 9 et 42 rédies.



**Figure 3.1.** Histogrammes de distribution du nombre de rédies (classes) de *Fasciola hepatica* par individu disséqué de *Galba cubensis*.

### 3.1.3 Discussion

Ces résultats constituent une première approche pour étudier les prévalences naturelles de *F. hepatica* dans les populations cubaines de *G. cubensis* et *P. columella*. L'espèce *G. cubensis* est considérée comme l'hôte prépondérant de ce parasite à Cuba (voir résultats chapitre 3 : infections expérimentales). C'est aussi l'espèce la plus commune sur les aires de pâturages (voir résultats chapitre 2) ce qui pourrait expliquer son implication majeure dans la fasciolose du bétail.

*P. columella* est considérée comme un très bon hôte intermédiaire de *F. hepatica* dans quelques pays où elle a été introduite comme l'Australie, le Brésil ou l'Argentine (Molloy et Anderson, 2006 ; Coelho *et al.* 2009 ; Prepelitchi *et al.* 2011) mais ceci n'avait jamais été démontré à Cuba. Notre étude est donc la première qui décrit l'infection naturelle de *P. columella* à Cuba et même dans la région Caraïbe. En effet, malgré la forte susceptibilité observée expérimentalement chez *P. columella* (Gutiérrez *et al.* 2002), aucun mollusque de cette espèce n'avait jusqu'ici été trouvé infecté sur le terrain. Les cinq individus que nous avons trouvés infectés présentaient la pigmentation

particulière du manteau considérée comme un très bon marqueur phénotypique de *P. columella* susceptible à *F. hepatica* (Gutiérrez et al. 2003b).

### 3.1.3.1. Appréciation générale de l'infection par les digènes

La présence de parasites de la famille Paramphistomatidae que nous avons détectés peut être reliée aux rôles de *G. cubensis* et des bovins comme hôtes intermédiaires et définitifs de ces digènes (Vázquez et al. 2014). Une étude menée dans l'Est de la France chez *G. truncatula* a montré une prévalence de 1,8% (en été) et de 2,5% (en automne) de *F. hepatica*, mais des prévalences de 8,9 à 20,3% de *Paramphistomum daubneyi* (Degueurce et al. 1999). Selon Rondelaud et al. (2004) il existe une compétition entre de *P. daubneyi* et *F. hepatica* : en cas de co-infection, au bout de 3 semaines post-infection, le paramphistome a tendance à exclure la douve.

Dans d'autres systèmes hôte-parasite, les prévalences chez les hôtes intermédiaires sont similaires. En Guadeloupe, dans les foyers d'arrière mangrove la prévalence naturelle observée chez l'espèce *Biomphalaria glabrata* infectée par *Schistosoma mansoni* varie entre 0,25% (Pointier et Théron, 1979) et 0,6% (Théron et al. 2004). En revanche, les prévalences chez les rats (hôtes définitifs) vont de 91% (Sire et al. 2001) à 94% (Théron et al. 2004). Ces valeurs sont comparables à celles que nous avons trouvées chez les bovins infectés par la douve du foie (chapitre 1). Elles confirment que des taux d'infestation très bas chez les hôtes intermédiaires peuvent suffire à maintenir le cycle du parasite et à engendrer de fortes prévalences chez les hôtes définitifs.

### 3.1.3.2. Prévalences et risques de fasciolose

Les prévalences pour *F. hepatica* trouvées ici (0-11,39%) sont cohérentes avec celles observées pour d'autres espèces de limnées dans d'autres aires de transmission. Par exemple, un échantillonnage extensif de l'espèce *Galba truncatula* réalisé en Angleterre entre 1960 et 1969 a montré des prévalences inférieures à 2% (Ollerenshaw, 1971). Une synthèse faite par Rondelaud et al. (2009) sur la même espèce *G. truncatula* donne des prévalences de 3% au Maroc et 11,4% en Espagne. De manière similaire, Kleiman et al. (2007) ont enregistré des prévalences de 0,67% en Argentine chez l'espèce *Galba viatrix*, tandis que Dreyfuss et al. (2005) ont observé des valeurs entre 1,4 et 1,8% chez *Omphiscola glabra* dans le centre de la France. Les prévalences et intensités observées

dans notre étude semblent donc parfaitement compatibles avec une transmission efficace de *F. hepatica* dans l'aire échantillonnée. En revanche, chez l'espèce *G. truncatula*, les prévalences décrites sont plus élevées (4,6-33%) dans les régions où *F. hepatica* infecte plus de 70% des hôtes définitifs que dans les aires où moins de 30% des bovins sont parasités (0-7,6%) (Rondelaud *et al.* 2009b). Il peut donc paraître surprenant d'avoir trouvé dans notre étude des prévalences modérées chez les mollusques (0-11,39%) alors que *F. hepatica* a été détectée chez plus de 70% des bovins (voir résultats chapitre 1). En revanche, on a trouvé ici des valeurs d'intensité chez *G. cubensis* (24,21 ± 20,02 SD) plus importantes que celles observées chez *G. truncatula* (12,3-17,1) par Mage *et al.* (2002). La production totale de cercaires chez *G. cubensis* pourrait donc être équivalente, voire supérieure à celle chez *G. truncatula*.

Différentes études ont signalé de fortes variations interannuelles de prévalences sur le terrain. Ces différences sont attribuées aux effets des conditions climatiques, particulièrement les précipitations qui conditionnent l'éclosion des œufs de *F. hepatica*. Par exemple, il a été montré en Angleterre que les prévalences chez l'espèce *G. truncatula* peuvent atteindre 20% quand les conditions sont favorables (Ollerenshaw, 1971). De manière similaire, un suivi de 141 sites dans le centre de la France pendant 12 années a révélé des oscillations de 3,3 à 7,2% (Mage *et al.* 2002), tandis qu'une étude sur deux populations en Algérie a montré des prévalences entre 4,6-5,9% et 2,6-3,1% (Mekroud *et al.* 2004). En revanche, les différences observées dans notre étude ne peuvent pas être liées aux conditions climatiques car tous les échantillons ont été collectés à la même période (et donc dans des conditions climatiques similaires).

### 3.1.3.3. Variations inter-populations

Bien que les abondances soient similaires, on a observé des variations importantes entre les populations tant pour les prévalences (0-11,39%) que pour les intensités moyennes (6,06-76). Puisque les prévalences chez les hôtes définitifs sont du même ordre de grandeur d'un site à l'autre, on se serait attendu à des prévalences similaires pour *G. cubensis* entre les sites (voir Rondelaud *et al.* (2009b) pour une comparaison avec *G. truncatula*). Ces différences trouvées entre populations peuvent être dues aux variations de conditions environnementales d'un site à l'autre (la richesse du milieu en éléments nutritifs), et/ou à des différences de compatibilité entre la population du

mollusque et l'isolat du parasite. Des études expérimentales doivent être menées pour tester si ces différences ont une base génétique ou pas (voir résultats expérimentaux dans ce chapitre).

#### 3.1.3.4. Variations intra-populations

Comme c'est généralement le cas dans les interactions hôte-parasite, les distributions de *F. hepatica* dans chaque site sont fortement agrégées. Ce résultat peut-être dû aux différences de susceptibilité parmi les individus. Ce fait peut être dû à des différences génétiques de compatibilité ou de résistance au parasite, comme précédemment montré expérimentalement par Meunier (2002) chez *G. truncatula*, et/ou à des différences d'âge ou de condition physiologique du mollusque au moment de l'infection. En fait, chez *G. truncatula*, la plus forte probabilité d'infection est obtenue à l'âge de quatre semaines (Rondelaud *et al.* 2009b). Par ailleurs, des *G. truncatula* bien nourris sont moins susceptibles à l'infection et montrent une production de rédies supérieure par rapport aux mollusques affamés (Kendall, 1949; Kendall et Ollerenshaw 1963; Abrous *et al.* 1999). Le stress induit par la pollution peut aussi augmenter le risque d'infection (Abrous *et al.* 1999).

La variation du nombre de rédies trouvées chez les individus de *G. cubensis* peut dépendre de plusieurs facteurs, liés à la biologie du parasite, à celle de la limnée ou encore à l'interaction entre les deux. Des valeurs moyennes de rédies trouvées chez l'espèce *G. truncatula* en France oscillent entre 15,8 et 25,7, selon qu'il s'agit d'une infection mono ou bi-miracidiale respectivement (Rondelaud *et al.* 2004). Dans notre étude, quelques individus de *G. cubensis* ont développé plus de 40 rédies avec un maximum de 76 rédies. Ce fait suggère une bonne compatibilité des populations cubaines de *G. cubensis* avec les souches de *F. hepatica* en présence.

La compréhension de l'écologie de la transmission des parasites par leurs hôtes est un aspect clé de l'épidémiologie des maladies. Les différences des prévalences entre sites montrent que la transmission de *F. hepatica* peut être très variable d'un site à l'autre. Bien que de fortes densités des populations de limnées augmentent la probabilité de s'infecter et de transmettre le parasite, une vaste proportion d'individus peut toujours rester non-infectée. La probabilité qu'a un individu hôte de s'infecter peut être fonction de plusieurs facteurs : (1) des variations temporelles de la population de

mollusques. La dynamique de la population de mollusques peut en effet ne pas coïncider avec la présence des hôtes définitifs, émetteurs d'oeufs de parasite, dans un site particulier. Par exemple, si les densités sont basses au moment de l'introduction du parasite la probabilité de rencontre diminue. On a montré (chapitres précédents) que les populations de *G. cubensis* semblent beaucoup plus stables que celles de *P. columella*, qui subiraient de plus fortes variations d'effectifs. Il est donc possible que la douve ait un hôte intermédiaire assuré toute l'année avec *G. cubensis* et plus occasionnel, en fonction des variations d'effectifs, avec *P. columella*. (2) La distribution spatiale dans l'habitat : une distribution agrégée des hôtes intermédiaires dans la zone fréquentée par les hôtes définitifs devrait augmenter la probabilité d'infection des mollusques. Au contraire, si ceux-ci ont une distribution « éparpillée », les probabilités de rencontre risquent d'être moindres (par exemple, le miracidium peut ne trouver pas un bon signal chimique des mollusques hôtes et mourir). (3) La capacité du parasite (miracidium) à persister dans le milieu et à se déplacer vers son hôte : si celui-ci a une faible tolérance aux conditions du milieu, il risque de mourir avant d'avoir atteint un hôte compatible. Inversement, si les miracidia survivent bien et sont actifs dans ce type de milieu, la probabilité d'infecter des mollusques augmente.

Pour ce qui concerne l'infection des hôtes définitifs, celle-ci peut être favorisée dans les systèmes où la dispersion des cercaires est plus importante. Ce peut être le cas dans les écosystèmes inondés sur de larges surfaces où les cercaires peuvent se disperser largement avant de s'enkyster sur un support. Cette dispersion peut être augmentée dans le cas de métacercaires flottantes (Rondelaud *et al.* 2004), mais nous n'avons pour l'instant pas de données sur cette stratégie à Cuba.

En résumé, il est important de maintenir nos efforts pour caractériser le plus finement possible les sites actifs de transmission de la fasciolose dans les différents biotopes. Les stratégies de contrôle dépendent de ce type de données.

### 3.2 Compatibilités douve-mollusque : infections expérimentales

**Article 9 : *Journal of Helminthology* (2014) 8: 434-440**

***Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella***

A.A. Vázquez, J. Sánchez, J.-P. Pointier, A. Théron, S. Hurtrez-Boussès

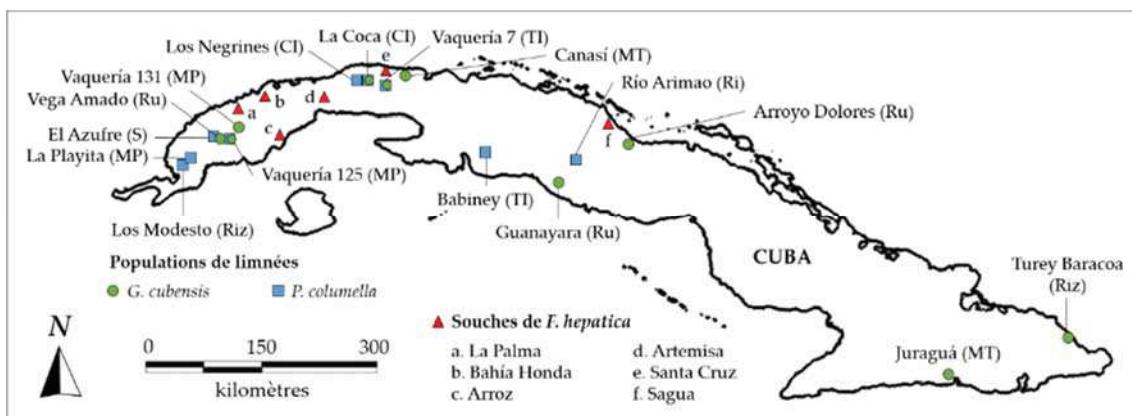
Plusieurs études ont montré comment la combinaison de différentes souches sympatriques de *F. hepatica* et de limnées peut augmenter la transmission par adaptation locale (Hurtrez-Boussès *et al.* 2001). D'autres observations montrent que dans certaines conditions, les combinaisons allopatриques entre douves et limnées arrivent à être très compatibles et peuvent ainsi améliorer la transmission (Gasnier *et al.* 2000 ; Cohelo *et al.* 2009 ; Dar *et al.* 2013). Ceci peut poser de graves problèmes épidémiologiques dans la mesure où les souches de douve peuvent circuler facilement (par le commerce du bétail) et être amenées à rencontrer des limnées allopatриques.

Ci-après nous décrirons les résultats d'infections expérimentales utilisant différentes combinaisons de souches géographiques de *F. hepatica* et de *G. cubensis* et *P. columella* de différentes localités. L'objectif est de mieux comprendre les effets de ces combinaisons et leurs conséquences sur la transmission de la fasciolose à Cuba.

#### 3.2.1 Matériels et Méthodes

##### 3.2.1.1 Echantillonnage des populations de limnées et des souches de parasites

Les échantillons biologiques tant de limnées que de souches de *F. hepatica* ont été prélevés dans différentes localités à Cuba (figure 3.2) et apportés vivants au Laboratoire de Malacologie à l'Institut de Médecine Tropicale à la Havane, Cuba. Dix populations de *G. cubensis* et neuf de *P. columella* ont été échantillonnées dans différents habitats en 2011 et 2012, à l'aide de passoires et de pinces.



**Figure 3.2.** Distribution géographique des sites d'échantillonnage des limnées et des souches de *Fasciola hepatica*. Riz = rizièvre ; M = mare ; S = source ; R = ruisseau ; CI = canal d'irrigation ; TI = terrain inondé ; F = fleuve.

Cinquante individus ont été échantillonnés par localité. Les mollusques de chaque localité ont été élevés au laboratoire à une température de 26 à 28°C jusqu'à la génération suivante. Tous les mollusques ont été nourris avec des algues selon une méthode de routine (Sánchez *et al.* 1995) en boîtes de Petri à raison de dix individus par boîte. Trois des neuf populations de *P. columella* sont des populations résistantes à *F. hepatica* (La Coca, La Playita et Babiney) selon les marqueurs phénotypiques de résistance (pattern de points de pigmentation du manteau différent) décrits par Gutiérrez *et al.* (2003).

Six souches de *F. hepatica* ont été échantillonnées dans des abattoirs de différentes localités à Cuba (Arroz, Bahía Honda, La Palma, Artemisa, Santa Cruz et Sagua ; figure 3.2). Les adultes de *F. hepatica* ont été récupérés vivants à partir des foies de bovins infectés et placés dans une solution de glucose (9%) et chlorure de sodium (0,85%), pour l'obtention des œufs. Trois heures après, les œufs ont été transférés dans une solution saline (0,85%) et placés à l'obscurité à 4°C. Les adultes ont été ensuite fixés dans l'alcool (95%) pour des études ultérieures.

### 3.2.1.2 Infections expérimentales

Les œufs de *F. hepatica* ont été placés dans de l'eau déchlorée à 28°C et à l'obscurité pour la maturation des miracidia. Après 14 jours, les œufs ont été exposés à la lumière blanche afin de stimuler leur éclosion. Pour chaque localité, trente limnées âgées d'une semaine ont été tirées au sort et placées dans des puits contenant de l'eau sans chlore (une limnée par puits). Cinq miracidia ont été placés dans chaque puits contenant une limnée. De l'eau a été ajoutée pour remplir complètement les puits qui ont ensuite été

recouverts d'une lame en verre afin d'éviter la sortie de l'eau des limnées. Après trois heures d'exposition aux miracidia, les limnées ont été transférées dans leurs boîtes d'élevage. L'infection de tous les mollusques exposés a été vérifiée par dissection 25 jours après. Quinze limnées de chaque espèce et de chaque localité n'ont pas été exposées aux miracidia et font donc office de témoins. L'infection des mollusques morts au cours de l'étude a systématiquement été vérifiée.

Pour mesurer l'intensité parasitaire dans chaque limnée, tous les mollusques ont été écrasés au 25ème jour post-exposition et soigneusement disséqués selon la méthodologie décrite par Caron *et al.* (2008). Toutes les rédies de chaque limnée ont été comptées. Les résultats ont été analysés pour tester les paramètres suivants : (1) susceptibilité des limnées à l'infection par *F. hepatica* ; (2) différences de susceptibilité entre les populations de limnées ; et (3) compatibilité entre les souches de douves et les populations des limnées en termes d'intensité parasitaire (Rondelaud *et al.* 2004). Nous avons ainsi évalué la prévalence parasitaire (pourcentage de mollusques infestés) l'intensité parasitaire (nombre de rédies par mollusque infesté) et la survie des mollusques infestés.

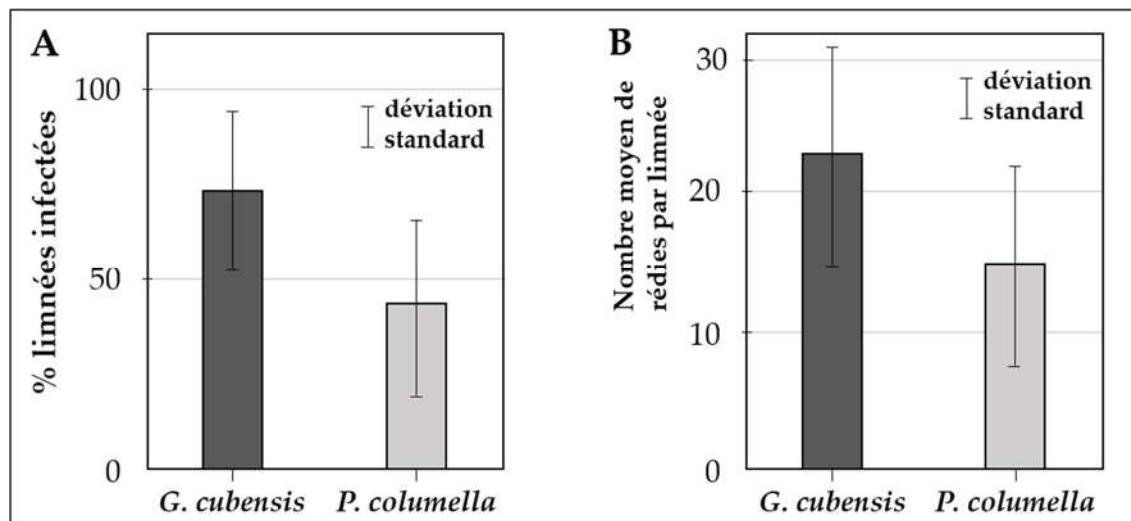
### 3.2.1.3 Analyse des données

Les comparaisons entre groupes ont été analysées par des analyses de variance simples et factorielles (ANOVA, populations de limnées et souches de douves comme facteurs), et entre espèces par le test non-paramétrique U Mann-Whitney. La preuve de Tukey a été utilisée pour déterminer les différences entre moyennes. Toutes les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de  $P < 0,05$ .

## 3.2.2 Résultats

Les essais d'infections expérimentales avec les deux espèces de limnées ont montré des niveaux de susceptibilité différents vis-à-vis de *F. hepatica* (figure 3.3, tableau 3.3). *Galba cubensis* est globalement plus susceptible à l'infection (52 à 93%, prévalence moyenne 69%) que *P. columella* (17 à 56%, prévalence moyenne 49%). Ainsi, chez *G. cubensis* il y a plus d'individus infectés et beaucoup plus de rédies par limnée (figure 3.3). Le nombre moyen de rédies chez *G. cubensis* est de 22,43 ( $\pm 11,82$  SD) tandis que

chez *P. columella* la moyenne est de 15,35 ( $\pm 8,35$  SD). Une valeur maximum de 55 rédies par mollusque a été observée chez chacune des deux espèces, bien que ces intensités parasitaires soient rares.



**Figure 3.3.** Proportion de limnées infectées (A) et production de rédies (B) chez *G. cubensis* et *P. columella* ; les populations résistantes de *P. columella* ne sont pas incluses.

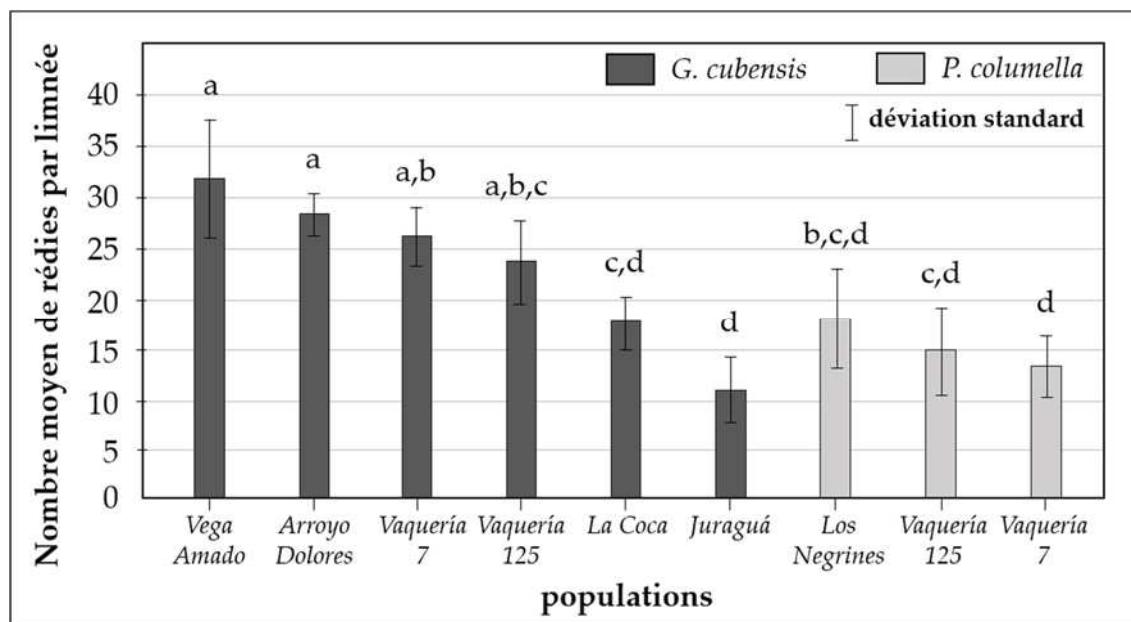
Les trois populations de *P. columella* avec des marqueurs phénotypiques typiques de résistance (Gutiérrez *et al.* 2003) n'ont montré aucune infection, quelle que soit la souche de douve à laquelle elles ont été exposées.

Que ce soit chez *G. cubensis* ou chez *P. columella*, une grande variabilité a été observée parmi les populations, les taux d'infection moyens variant de 19 à 97% et de 21 à 92% respectivement (tableau 3.3).

**Tableau 3.3.** Taux d'infection (%) de *Galba cubensis* et *Pseudosuccinea columella* de différentes localités exposées expérimentalement à des souches différentes de *Fasciola hepatica* de Cuba (données 25ème jour post-exposition, N=30 pour chaque population). Trois populations de *P. columella* résistantes provenant de Babiney, La Playita et La Coca se sont avérées résistantes aux six souches de *F. hepatica* testées (données non montrées).

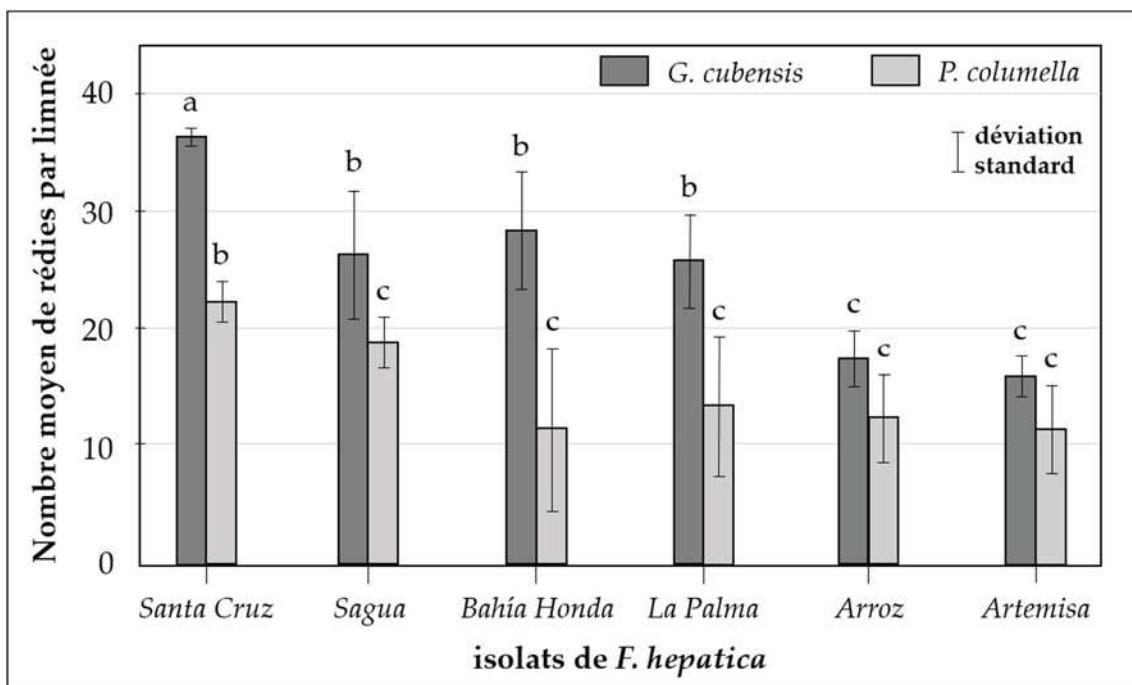
	Souches de <i>F. hepatica</i>						
	La Palma	Bahía Honda	Arroz	Artemisa	Santa Cruz	Sagua	Moyenne %
<b><i>G. cubensis</i></b>							
Vega Amado	-	-	-	-	70	23	47
Vaquería 125	-	-	100	73	-	-	87
Vaquería 131	-	-	100	-	-	-	100
La Coca	-	-	97	87	63	-	82
Vaquería 7	-	-	100	83	83	20	72
Canasí	-	-	90	-	-	-	90
Guanayara	-	-	100	-	-	-	100
Arroyo Dolores	53	33	100	83	90	0	60
Juraguá	-	-	83	100	-	33	72
Turey Baracoa	-	-	100	-	-	-	100
Moyenne %	53	33	97	85	77	19	
<b><i>P. columella</i></b>							
Los Modesto	-	-	80	-	-	-	80
El Azufre	-	-	100	-	-	-	100
Vaquería 125	-	-	97	77	20	10	51
Los Negrines	-	-	-	97	57	43	66
Vaquería 7	43	40	-	-	30	10	27
Moyenne %	43	40	92	87	36	21	

Les *G. cubensis* provenant de Vega Amado, Arroyo Dolores, Vaquería 7 et Vaquería 125 produisent deux fois plus de rédies (moyenne  $28 \pm 8.5$  SD) que celles de La Coca et Juraguá (moyenne  $14 \pm 6.5$  SD), quelle que soit la souche de douve utilisée (figure 3.4). En revanche, il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de corrélations entre le taux d'infection et le nombre de rédies par mollusque chez aucune des deux espèces (*G. cubensis* :  $r = -0,118$  ;  $P = 0,542$  ; *P. columella* :  $r = 0,144$  ;  $P = 0,569$ ).



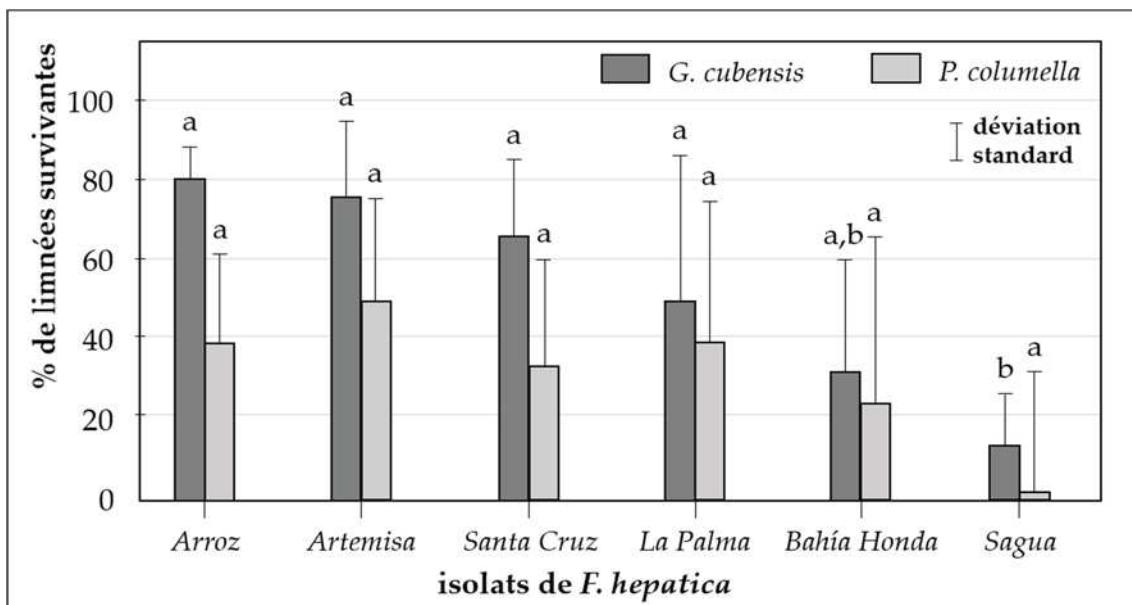
**Figure 3.4.** Production de rédies chez *G. cubensis* et *P. columella* infectées de différentes localités avec cinq miracidia de *F. hepatica*. Des lettres différentes signifient les différences significatives entre les moyennes.

Les souches de *F. hepatica* Arroz et Artemisa montrent la plus forte infectivité pour n'importe quelle espèce ou population de limnée (97 et 85% pour *G. cubensis*, et 92 et 87% pour *P. columella* respectivement). En revanche la souche de Sagua présenté toujours un taux d'infection très faible (19 et 21%) (Tableau 3.3). Les souches de *F. hepatica* montrent également une production variable du nombre de rédies par mollusque, indépendamment de la combinaison espèce de limnée/population utilisée (figure 3.5). Les souches de Santa Cruz et Bahía Honda sont les plus productives tandis que celle d'Artemisa est la moins productive.



**Figure 3.5.** Production de rédies de chaque souche de *F. hepatica* chez les espèces de limnées *G. cubensis* et *P. columella*. Barres verticales = déviation standard.

Le nombre de mollusques vivants au 25ème jour post-infection varie légèrement entre espèces de limnée et en fonction des souches de parasite (figure 3.6). Dans tous les cas, la survie est plus élevée chez *G. cubensis* que chez *P. columella*, quelle que soit la souche de douve. Les souches de *F. hepatica* les moins virulentes pour *G. cubensis* sont celles d'Arroz et d'Artemisa, suivies par celle de Santa Cruz. Que ce soit pour *G. cubensis* ou *P. columella*, la souche de Sagua apparaît comme la plus virulente.



**Figure 3.6.** Proportion de limnées survivantes chez *G. cubensis* et *P. columella*, au jour 25 post-infection avec chaque souche de *F. hepatica*.

### 3.2.3 Discussion

Jusqu'à présent les différences de compatibilité entre *G. cubensis* et *P. columella* n'avaient jamais été étudiées par des expériences au laboratoire en utilisant différentes souches de *F. hepatica*. Les résultats qui montrent des différences d'infectivité et de production larvaire parmi les souches de *F. hepatica* pourraient expliquer pourquoi certaines régions de Cuba sont plus sujettes aux épidémies de fasciolose (par exemples les isolats de Bahía Honda et La Palma à Pinar del Río). Malheureusement, il n'a pas été possible de tester d'autres souches de *F. hepatica* provenant de la région la plus orientale de Cuba.

Les différences trouvées entre les deux espèces de limnées concernent les taux d'infection, la production de rédies et la survie des individus infectés. Elles montrent que *G. cubensis* est l'hôte le plus compatible pour *F. hepatica* à Cuba. Perera (1996) et Vázquez *et al.* (2009) avaient envisagé ce résultat en se basant sur la présence dominante de *G. cubensis* dans les sites de transmission de fasciolose et sur les patterns de distribution des deux espèces de limnées. Contrairement à des études réalisées en Amérique du Nord qui ont montré que *P. columella* est plus susceptible que *G. cubensis* à l'infection par *F. hepatica* (Cruz-Reyes et Malek, 1987) nos résultats suggèrent que *P. columella* serait moins compatible. Ceci dit, la plupart des populations montrent des taux d'infection et une production larvaire importants et *P. columella* peut donc être considérée comme un hôte non négligeable de la fasciolose. Font exception quelques populations dont notre étude confirme qu'elles sont résistantes à la fasciolose. Ces populations résistantes se trouvent dans des zones où *G. cubensis* est également présente (Gutiérrez *et al.* 2005 ; Vázquez *et al.* 2009) et permet de maintenir le cycle de la douve du foie à des niveaux de forte endémie (Rojas *et al.* 2010). La présence permanente et de forts taux de *F. hepatica* dans ces zones fait qu'une pression de sélection permanente et intense s'exerce sur les mollusques. Cela pourrait permettre d'expliquer le maintien de génotypes résistants de *P. columella* malgré un coût à la résistance.

Toutefois, à côté des populations de *P. columella* résistantes, quelques autres (*e.g.* El Azufre, souche sensible) ont montré une susceptibilité très forte au parasite mais une

très faible survie post-infection quand on teste une souche de douve particulière (e.g. Arroz). On pourrait voir là un signe de maladaptation (Meunier, 2002).

Les résultats obtenus à Cuba suggèrent que quelques populations de limnées confrontées à des souches allopatriques de *F. hepatica* peuvent parfaitement transmettre le parasite. Certaines souches ou espèces se sont révélées plus compatibles avec des souches de douve distantes, indiquant qu'une mauvaise gestion du bétail infecté ainsi que l'introduction de limnées très compatibles, peuvent provoquer de nouvelles épidémies de fasciolose dans certaines localités. Des résultats similaires ont été observés au Brésil (Coehlo *et al.* 2009), en France (Gasnier *et al.* 2000) et en Egypte (Dar *et al.* 2013) avec des combinaisons allopatriques. En revanche, beaucoup de variabilité a été observée dans ce type d'interaction, suggérant que la relation entre les mollusques et les parasites dépend de multiples variables (e.g. écologie du mollusque, diversité génétique des mollusques et parasites, gestion des hôtes définitifs, etc.). Ainsi des combinaisons sympatriques de mollusques et de parasites ont été trouvées parfois plus efficaces (Osnas et Lively, 2011), parfois moins (Goumghar *et al.* 2001). Plusieurs travaux se sont penchés sur l'adaptation locale dans ce type d'interaction (voir par exemple pour revue Hurtrez-Boussès *et al.* 2001). Le résultat de ces relations concernant l'infection par le parasite est probablement fortement lié à : (1) la durée de l'interaction (les anciennes combinaisons pourraient être mieux co-adaptées) ; (2) la capacité de dispersion des hôtes et des parasites (voir Gandon *et al.* (1996) ; Gandon et Michalakis, (2002) : on s'attend à une adaptation locale quand la dispersion du parasite est supérieure à celle de l'hôte, ce qui est le plus probable dans le cas du système douve/limnée) ; (3) l'écologie des hôtes intermédiaires et définitifs (des nécessités écologiques similaires augmentent la probabilité de rencontre); et (4) la diversité génétique (des compatibilités de génotypes mollusques et parasites peuvent augmenter l'infection et la reproduction du parasite).

Le scénario de transmission de la fasciolose est fortement dépendant de l'existence d'une richesse spécifique des limnées car de nombreuses espèces peuvent jouer le rôle d'hôte intermédiaire de *F. hepatica* dans le monde (Correa *et al.* 2011). Heureusement, ce scénario à Cuba est considérablement plus facile à décrire avec seulement deux espèces de limnées impliquées dans la transmission du parasite d'autant que ces

espèces ont des caractéristiques écologiques différentes. Tandis que *G. cubensis* est largement répandue dans toute l'île de Cuba avec des populations présentes dans des habitats naturels ou anthropisés et parfois pollués, *P. columella* n'a jamais été trouvée dans la partie orientale de l'île et paraît préférer les habitats moins anthropisés (Vázquez *et al.* 2009). Au cours de cette étude, nous avons montré que ces deux espèces sont également différentes en ce qui concerne leur susceptibilité au parasite et leur capacité de transmission en étroite relation avec la souche de *F. hepatica* utilisée.



---

## Conclusions et Perspectives

### **Considérations générales sur la transmission de *Fasciola hepatica* et le contrôle de la fasciolose : applicabilité des résultats obtenus**

#### *Des risques à surveiller*

Les aires de répartition des espèces sont fortement conditionnées par les caractéristiques climatiques. Les hôtes et les parasites n'échappant pas à cette règle, la distribution des maladies est dépendante du climat et impactée par les modifications de celui-ci (Pavloski, 1966, Emmanuel *et al.* 2011). Plus largement, l'épidémiologie de bon nombre de maladies infectieuses est modifiée par les bouleversements des facteurs environnementaux (Shuman, 2010). Sans tenir compte de ces changements, les risques épidémiologiques ne peuvent pas être correctement évalués, comme le montrent des exemples de maladies dont l'épidémiologie est connue (dengue, maladies diarrhéiques et respiratoires aigües) mais pour lesquelles des prévisions ont échoué faute de connaissances précises sur les dynamiques spatio-temporelles (Shuman, 2010). La fasciolose est un exemple de cette problématique et Cuba, ainsi que d'autres régions dans le monde, sont susceptibles de voir un changement dans la dynamique du système hôte – parasite suite aux changements d'origine anthropique.

Une des raisons majeures de la très large distribution de la fasciolose dans le monde est probablement la capacité du parasite *F. hepatica* à infecter une vaste gamme d'hôtes tant intermédiaires que définitifs (Hurtrez-Boussès *et al.* 2001 ; Correa *et al.* 2010 ; WHO, 2013). On peut donc considérer que dès qu'une espèce de mollusque compatible est présente, la grande douve peut s'installer dans un nouvel endroit. Les conditions de température et d'humidité, couplées aux changements de régimes pluviométriques, peuvent permettre la colonisation de nouvelles aires par les limnées. Cette expansion est probablement favorisée par un certain nombre d'activités humaines (transport de réserves d'eau, commerce de plantes aquatiques, etc.), qui augmentent les risques d'introduction de mollusques Lymnaeidae dans différents endroits. C'est d'ailleurs ce qu'on observe avec la colonisation très récente de *G. truncatula* sur l'Altiplano bolivien, ou l'invasion de *P. columella* ou *G. schirazensis* dans plusieurs régions du monde (Correa, 2010 ; Lounnas *et al.* soumis : article No. 7). Sous réserve de températures assez élevées,

*G. cubensis* n'échappe pas à la règle : une étude récente menée par Alda *et al.* (en prép) montre que cette espèce s'est subitement étendue en Amérique Latine, notamment en Equateur où les auteurs la décrivent dans dix localités où elle était absente il y a quelques décennies. La situation est d'autant plus préoccupante que *G. cubensis* semble faire preuve d'une forte plasticité écologique et a une capacité marquée à occuper une large gamme d'habitats, même très instables ou très pollués.

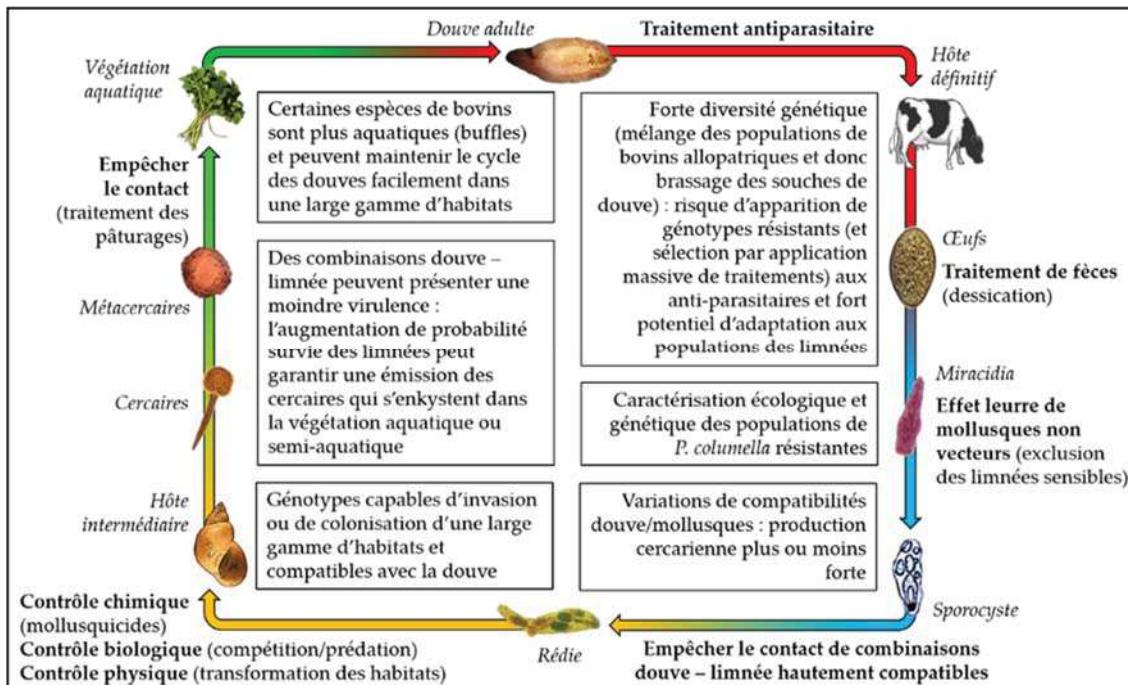
Si à cette équation on additionne les effets de l'activité humaine (notamment gestion des troupeaux, extension des zones irriguées, etc.) qui facilitent la convergence des autres variables nécessaires pour initier ou maintenir la fasciolose, une recrudescence de cette maladie est prévisible.

Cuba devrait donc non-seulement être considérée comme zone à risque car l'île possède deux espèces de Lymnaeidae clairement compatibles et dont les populations sont capables de colonisation rapide, mais aussi parce qu'on n'est pas à l'abri de l'installation d'une nouvelle espèce hôte (par exemple *G. schirazensis*). La présence de plusieurs autres espèces de mollusques d'eau douce (voir chapitre 2) peut être un frein à une nouvelle colonisation dans ce système insulaire. Toutefois, Cuba présente une haute diversité d'écosystèmes et il n'est pas exclu que cette gamme de niches écologiques puisse permettre l'installation d'une nouvelle espèce, qui pourrait encore augmenter les risques de transmission dans des zones jusqu'ici épargnées.

Ici, dans cette étude, on a essayé d'utiliser une approche intégrative en abordant le plus complètement possible les différents aspects qui affectent le système hôte – parasite exploré. Cette approche, en milieu insulaire, nous a permis d'aborder relativement simplement les questions scientifiques posées : (1) diversité de la douve du foie (tant du point de vue génétique que des capacités d'infection des hôtes définitifs), (2) écologie et biologie des limnées hôtes intermédiaires (distribution, adaptation aux différents écosystèmes et structure génétique), (3) différences de compatibilité douves – limnées. Ces résultats, en plus de contribuer aux connaissances des systèmes hôtes – parasites et à la compréhension des risques d'émergences ou réémergences, peuvent être utilisés en vue d'un meilleur contrôle de la maladie.

### Quelles possibilités de contrôles ?

Le contrôle de *F. hepatica* peut être effectué sur n'importe lequel des éléments qui interviennent dans le cycle de vie du parasite. La figure 6 donne un aperçu des opportunités de contrôler la fasciolose chez les humains ou les animaux domestiques, ainsi que les possibles contraintes ou avantages examinés à la suite de nos résultats.



**Figure 6.** Diagramme qui relie les opportunités de contrôle à chaque étape du cycle biologique de *Fasciola hepatica*. Dans les cadres intérieurs : avantages ou contraintes possibles d'après les résultats obtenus dans cette étude.

Chez le bétail ou les humains, des traitements anti-parasitaires peuvent être utilisés pour lutter contre les douves adultes. Le médicament de choix est le Triclabendazole (Fried et Abruzzi, 2010), réputé efficace. Toutefois, ces traitements sont lourds, coûteux et plusieurs cas de résistances ont été décrits dans le monde (McConville *et al.* 2006). A l'issue de notre étude, on peut s'inquiéter en observant qu'un troupeau traité au Triclabendazole présente des prévalences similaires à celles des lots non-traités ! L'évolution de la résistance est bien documentée pour de nombreux exemples d'applications de traitements contre des maladies ou d'insecticides contre des vecteurs. Des travaux emblématiques sont notamment ceux sur la résistance des moustiques aux insecticides (Raymond *et al.* 1991, 2001) : des variants résistants, apparus naturellement dans les populations, sont sélectionnés par l'application intense d'insecticides (alors qu'ils sont contre-sélectionnés dans les zones non traitées, à cause d'un coût à la

résistance). De plus, ces variants se propagent rapidement dans différentes régions du monde par migration, le plus souvent liée aux activités humaines (transport des moustiques adultes dans les avions ou des larves avec des produits exportés pouvant stocker de l'eau -pneus, pots de plantes, etc.-). Les mêmes mécanismes peuvent s'appliquer aux risques de résistance chez la douve. On a en effet observé chez les douves une diversité génétique élevée à l'intérieur des isolats, en grande partie liée au régime allofécondant de ces parasites. Cela suggère que la probabilité d'apparition de variants résistants est sans doute élevée et que ceux-ci pourraient être facilement sélectionnés par l'utilisation massive de traitements. De plus, les souches analysées ne présentent pas d'importantes différenciations génétiques entre elles, ce qui signifie qu'il y a du mélange entre les différents génotypes. La circulation du bétail entre les différentes régions est probablement à l'origine de ce brassage. Il se pourrait aussi que des hôtes définitifs sauvages (par exemple les sangliers ou les rongeurs) assurent la dispersion des douves sur des distances importantes. Pour aller plus loin, il faudrait pouvoir analyser la diversité génétique des douves en ayant une meilleure connaissance de l'histoire individuelle du bétail hôte définitif : quel est son âge (on s'attend à une accumulation de parasites au cours de la vie et à une augmentation de la diversité si les souches contaminantes sont variées) ? Où a-t-il pâtré (plus l'animal a circulé, plus les sources de contamination devraient être variées et donc la diversité devrait augmenter) ? Quels traitements a-t-il reçus et quand (on s'attendrait à de forts goulots d'étranglement et donc une réduction de la diversité juste après le traitement, puis à une nouvelle augmentation de diversité avec des nouvelles contaminations) ? Evidemment, toutes ces données sont compliquées à obtenir car il est difficile d'accéder aux informations dans les abattoirs à Cuba. Une autre approche pourrait consister à comparer la diversité génétique des douves chez des hôtes domestiques (potentiellement traités) et sauvages (a priori non-traités).

Au niveau des miracidia, l'attraction des larves de digènes par des mollusques non vecteurs a été discutée par Johnson et Thieltges (2010) et particulièrement explorée chez le parasite *Schistosoma mansoni* et l'ampullaire *Marisa cornuarietis* (Combes et Moné, 1987). Cependant, ces études utilisent généralement des espèces de mollusques appartenant à des familles ou des ordres différents de ceux de l'hôte typique. Même s'il

a été montré ailleurs dans le monde que *F. hepatica* peut infester des mollusques autres que des Lymnaeidae (notamment Planorbidae ; Hamed *et al.* 2009), on ne sait rien de cette possibilité à Cuba.

En revanche, à l'échelle intra-spécifique, on a trouvé à Cuba différentes populations de *P. columella* (hôte normal de *F. hepatica*) résistantes à l'infection. On a essayé de caractériser tant écologiquement que génétiquement ces populations, dont on aurait pu imaginer qu'elles pourraient servir comme agents de contrôle biologique des populations sensibles. Ces populations sont génétiquement un peu plus diversifiées que les autres ; elles pourraient donc avoir un potentiel adaptatif plus important, qui leur permettrait de s'adapter à une large gamme d'habitats. Au contraire, on a trouvé ces populations limitées à des endroits très particuliers du point de vue physico-chimique, ce qui semble laisser peu de chances qu'elles puissent coloniser les zones de populations sensibles.

En ce qui concerne les larves qui se développent chez les mollusques, on a observé des variations de taux d'infection et de production de rédies selon les souches du parasite et la population de limnée. Dans tous les cas, la comparaison des données expérimentales, des prévalences sur le terrain et des taux d'infection des hôtes définitifs montre qu'il suffit que quelques mollusques compatibles soient infectés pour que la douve soit très présente chez les hôtes définitifs. Des combinaisons mollusque/douve qui permettent une plus grande production de cercaires peuvent encore augmenter les risques de transmission et rendre encore plus difficile un contrôle efficace et durable. Pour mieux comprendre ces variations de compatibilité il faudrait intensifier les travaux expérimentaux pour (1) caractériser les traits d'histoire de vie des hôtes et des parasites dans des combinaisons allopatriques et sympatriques (comme fait Meunier, 2002 sur le système *G. truncatula*-*F. hepatica*). Nous avons commencé à aborder des traits de vie du parasite (infectivité, virulence, production de rédies) ; il faudrait en ajouter d'autres (durée pré-patente, taux d'émission cercarienne, production de métacercaires, proportion de métacercaires flottantes). Il serait intéressant en parallèle de suivre les traits d'histoire de vie des limnées infectées et témoins : survie post-infestation, fécondité précoce et tardive, survie et fécondité après « guérison ». Cela permettrait d'avoir une image plus complète de l'interaction et de mieux évaluer la production de

descendants de la douve en fonction des combinaisons avec les souches de mollusques (par exemple un parasite qui a une forte infectivité mais tue beaucoup de mollusques produira finalement peut-être moins de descendants qu'un parasite qui se retrouve avec des prévalences plus faibles mais qui affecte peu la survie des mollusques). Ces expériences pourraient aussi être faites dans différentes conditions de nutrition ou de qualité de l'eau, pour voir en quoi les paramètres du milieu peuvent modifier les résultats de l'interaction. (2) En complément, il sera intéressant d'aborder l'interaction du point de vue immunologique et d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de résistance et de susceptibilité des hôtes aux parasites.

Le contrôle pourrait aussi passer par le fait de réduire les contacts entre les hôtes définitifs et les hôtes intermédiaires, pour que le cycle du parasite ne fonctionne pas correctement. Ici, on butte sur deux problèmes essentiels. (1) En tenant compte de la forte amphibiase de *G. cubensis* et de la forte possibilité pour *P. columella* de se maintenir dans des milieux très aquatiques, les mollusques hôtes peuvent potentiellement occuper tous les types de milieux d'eaux douces, des plus stables aux plus temporaires. (2) On retrouve la même tendance pour les vaches (plutôt dans des milieux émergés) et les buffles (qui sont présents dans des zones toujours en eau). A moins de changer franchement la façon de gérer les troupeaux, par exemple en ne les laissant plus pâturer librement et en évitant de les utiliser pour les travaux agricoles, on voit mal comment éviter les contacts hôtes définitifs – hôtes intermédiaires.

Différentes stratégies de contrôle ont été décrites chez les mollusques : (1) contrôle biologique (utilisation des mollusques compétiteurs qui déplacent les espèces hôtes, introduction de parasites d'hôtes définitifs différents qui éliminent les larves de *F. hepatica* chez les mollusques –par exemple *Echinostoma revolutum*, voir Suhardono *et al.* (2006)-). On a vu que les espèces *G. cubensis* et *P. columella* peuvent se trouver en présence d'autres espèces de mollusques. Toutefois, les abondances de *P. columella* sont apparues comme indépendantes de la diversité en mollusques ; on voit donc mal quels mollusques compétiteurs pourraient les limiter. Notre étude a en revanche montré une relation négative entre diversité en mollusques (notamment Thiariidés) et abondance en *G. cubensis*. Un contrôle des populations de *G. cubensis* pourrait être envisagé en favorisant les peuplements de Thiariidés, au moins dans les sites stables et

peu pollués où ces mollusques peuvent se maintenir correctement. La situation est plus compliquée dans les sites soumis à des assèchements, auxquels les Thiaridés ne résistent pas (contrairement à *G. cubensis*). Dans ce cas, il faudrait étudier la possibilité de gérer les niveaux d'eau pour les maintenir plus constants dans les zones fréquentées par les hôtes définitifs. En revanche, il semblerait que cette lutte biologique ne soit pas une bonne solution dans les sites les plus pollués où les communautés sont appauvries et où *G. cubensis* a tendance à se retrouver dominante. Dans ce cas, les stratégies de lutte biologique contre les mollusques vecteurs devraient d'abord passer par un bon contrôle du rejet des effluents et par de l'épuration des eaux. (2) Une autre stratégie de lutte contre les mollusques décrite dans la littérature est le contrôle chimique (utilisation de mollusquicides). Ce type de méthode présente de nombreux défauts, notamment car les produits utilisés manquent de spécificité et leur écotoxicité est souvent un problème (notamment pour les vertébrés qui consomment les mollusques). Compte-tenu de notre étude, et sous réserve des limites ci-dessus, ce type de traitement pourrait être envisageable pour les *P. columella* qui présentent peu de diversité génétique. A condition que les souches présentes soient sensibles, on pourrait penser à un contrôle efficace. En revanche, la méthode serait sans doute peu utile contre *G. cubensis* ; étant donné sa diversité génétique un peu plus importante et les capacités de colonisation de ces mollusques, on risquerait de sélectionner et voir se propager des variants résistants, comme évoqué plus haut au sujet des moustiques résistants aux insecticides. (3) Le contrôle physique passe par la transformation des habitats. Comme dit ci-dessus, la gestion des niveaux d'eau, en tenant compte des caractéristiques écologiques des vecteurs, pourrait être une piste intéressante. Avant d'être mise en œuvre elle nécessiterait des études sérieuses combinant biologie des populations et hydrologie. La limitation des sites pollués (cf. ci-dessus) semble, au-delà des avantages écologiques et sanitaires qu'elle peut représenter, une stratégie intéressante pour limiter les populations de *G. cubensis* et donc diminuer le nombre des foyers potentiels de fasciolose. En tout cas, il est toujours indispensable d'intégrer toutes les stratégies de contrôle (« lutte intégrée »), ce qui pourra uniquement arriver au contrôle efficace dans les zones de transmission.

Cette discussion souligne la nécessité de prendre en considération les différents compartiments du système hôte-parasite et d'utiliser des approches multiples. On a fait dans ce travail un pas en avant en combinant les descriptions de terrain, la génétique des populations et les expériences d'infestations, mais il faudrait aller plus loin. Cette façon de travailler devrait être maintenue en veillant à appliquer systématiquement les différentes approches sur chacune des populations (ce qu'on n'a pas pu forcément faire ici pour des contraintes techniques). Elle devrait être étendue pour étudier un plus grand nombre de populations, sur toute la surface de l'île. En effet, on n'a pas eu l'opportunité d'explorer la structure génétique des douves dans la partie la plus orientale de Cuba à cause de limitations logistiques. Il serait intéressant de tester si on retrouve les mêmes patterns que ceux observés dans la zone occidentale et centrale. De plus, les approches que nous avons utilisées doivent être renforcées par d'autres disciplines, notamment l'hydrologie sur le terrain et l'immunologie et les interactions moléculaires en laboratoire.

Pour finir, si des stratégies de contrôle de la fasciolose peuvent être envisagées en tenant compte de multiples paramètres, biologiques et environnementaux, les problèmes peuvent facilement empirer sans vigilance et en faisant des erreurs de gestion. Il semble donc important que scientifiques, décideurs des stratégies de gestion du bétail et des milieux et responsables administratifs de l'agriculture et de l'élevage travaillent ensemble et se concertent, en vue d'un contrôle efficace et durable de la fasciolose. C'est dans cet esprit que nous sommes en train de mettre en place des formations sur la fasciolose, abordant les résultats obtenus, à destination des décideurs impliqués dans la gestion du bétail à Cuba.

## Références Bibliographiques

- Abrous, M., Rondelaud, D. & Dreyfuss, G.** (1999) *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: influence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research*, **85**, 765-769.
- Afshan, K., Valero, M., Qayyun, M., Peixoto, R., A, M. & Mas-Coma, S.** (2013) Phenotypes of intermediate forms of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in buffaloes from Central Punjab, Pakistan. *Journal of Helminthology*. doi: 10.1017/S0022149X13000369.
- Agrawal, A. & Lively, C.** (2001) Parasites and the evolution of self-fertilization. *Evolution*, **55**, 869-879.
- Aguayo, C. & Jaume, M.** (1947) Catálogo de los moluscos cubanos. La Habana, Edición Mimeografiada.
- Alves, R., van Rensburg, L. & van Wyk, J.** (1988) *Fasciola* in horses in the Republic of South Africa: a single natural case of *Fasciola hepatica* and the failure to infest ten horses either with *F. hepatica* or *Fasciola gigantica*. *Onderstepoort J Vet Res*, **55**, 157-163.
- Andrews, S.** (1999) The life cycle of *Fasciola hepatica*. In *Fasciolosis* Dalton, J. (Ed.). Wallingford, CABI Publishing.
- Arjona, R., Riancho, J. & Aguado, J.** (1995) Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of the disease. *Medicine*, **74**, 13-23.
- Arnaud-Haond, S. & Belkhir, K.** (2007) GenClone 2.0: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. <<http://si-wagner.ualg.pt/ccmar/maree/software.php?soft=genclon>>.
- Ashrafi, K., Massoud, J., Holakouei, K., Mahmoodi, M., Joafshani, M., Valero, M., Fuentes, M., Khoubanne, M., Artigas, P., Bargues, M. & Mas-Coma, S.** (2004) Evidence Suggesting that *Fasciola gigantica* Might be the Most Prevalent Causal Agent of Fascioliasis in Northern Iran. *Iranian Journal of Public Health*, **33**, 31-37.
- Baker, H.** (1925) Anatomy of *Lanx*, a limpet-like lymnaeid mollusk. *Proceeding of the California Academy of Sciences*, **14**, 143-169.
- Baker, H.** (1967) Support for Baker's law – as a rule. *Evolution*, **21**, 853-856.
- Bank, R.** (2011) Fauna Europaea project. Systematical and distributional checklist of species-group taxa of continental Mollusca of Europe. In version 2.4. <[www.faunaeur.org](http://www.faunaeur.org)>.
- Bargues, M. & Mas-Coma, S.** (2005) Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *Journal of Helminthology*, **79**, 257-267. doi: 10.1079/JOH2005297.
- Bargues, M., Artigas, P., Khoubbane, M., Ortiz, P., Naquira, C. & Mas-Coma, S.** (2012) Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & Vectors*, **5**, 174.
- Bargues, M., Artigas, P., Mera y Sierra, R., Pointier, J. & Mas-Coma, S.** (2007) Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **101**, 621-641. doi: 10.1179/136485907X229077.
- Bargues, M., Horák, P., Patzner, R., Pointier, J., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C. & Mas-Coma, S.** (2003) Insights into the relationships of Palearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stenicoline intermediate hosts species of *Fasciola hepatica*. *Parasite*, **10**, 243-255.7
- Bargues, M., Vigo, M., Horák, P., Dvorak, J., Patzner, R., Pointier, J., 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. *Infection, Genetics and Evolution*, **1**, 85-107.
- Bargues, M.D., Mera y Sierra, R., Artigas, P. & Mas-Coma, S.** (2012) DNA multigene sequencing of topotypic specimens of the fascioliasis vector *Lymnaea diaphana* and phylogenetic analysis of the genus *Pectinidens* (Gastropoda). *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **107**, 111-124.

- Bech, N., Beltran, S., Portela, J., Rognon, A., Allienne, J., Boissier, J. & Théron, A.** (2010) Follow-up of the genetic diversity and snail infectivity of a *Schistosoma mansoni* strain from field to laboratory. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**, 1039-1045. doi: 10.1016/j.meegid.2010.06.012.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Catch, F.** (2004) GENETIX 4.05.2. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR, 5000.
- Beovides, L., Silveira, E., Pérez, J. & Olazábal, E.** (2006) Evaluación de los factores que inciden en la mortalidad por fasciolosis en la provincia de Villa Clara, Cuba. *Revista Electrónica de Veterinaria*, **7**, n020206.
- Beran, L.** (2008) A contribution to distribution of genus *Stagnicola* and *Catascopia* (Gastropoda: Lymnaeidae) in the Czech Republic. *Malacologica Bohemoslovaca*, **7**, 70-73.
- Brito, E., Hernández, M., De la Fé Rodríguez, P. & Silveira, E.** (2010) Prevalencia, decomisos de hígado y pérdidas económicas por *Fasciola hepatica* en mataderos bovinos de tres provincias de la región central de Cuba. *Revista Electrónica de Veterinaria*, **11**, n040410.
- Burch, J.** (1982) North American freshwater snails: identification keys, generic synonymy, supplemental notes, glossary, references, index. *Walkerana*, **2**, 1-80.
- Burch, J.** (1982) North American freshwater snails: identification keys, generic synonymy, supplemental notes, glossary, references, index. *Walkerana*, **2**, 1-80.
- Bush, A., Lafferty, K., Lotz, J. & Shostak, A.** (1997) Parasitology meets Ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, **83**, 575-583.
- Caple, I., Jainudeen, M., Buick, T. & Song, C.** (1978) Some clinico-pathologic findings in elephants (*Elephas maximus*) infected with *Fasciola jacksoni*. *Journal of Wildlife Diseases*, **14**, 110-115. doi: 10.7589/0090-3558-14.1.110.
- Caron, Y., Celi-Erazo, M., Hurtrez-Boussès, S., Lounnas, M., Pointier, J., Saegerman, C. & Benítez-Ortíz, W.** (2015) New insight in lymnaeid snails (Mollusca, Gastropoda) as intermediate hosts of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Ecuador.
- Caron, Y., Lasri, S. & Loisson, B.** (2007) *Fasciola hepatica*: An assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. *Veterinary Parasitology*, **149**, 95-103.
- Caron, Y., Martens, K., Lempereur, L., Saegerman, C. & Loisson, B.** (2014) New insight in lymnaeid snails (Mollusca, Gastropoda) as intermediate hosts of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Belgium and Luxembourg. *Parasites & Vectors*, **7**, 66.
- Caron, Y., Rondelaud, D. & Loisson, B.** (2008) The detection and quantification of a digenetic infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitology Research*, **103**, 735-744. doi: 10.1007/s00436-008-1086-1.
- Carvalho, O., Cardoso, P., Lira, P., Rumi, A., Roche, A., Berne, E. & Caldeira, R.** (2004) The use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnaea columella*, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca: Lymnaeidae). *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**, 503-507.
- Cichy, A., Faltýnková, A. & Zbikowska, E.** (2011) Cercariae (Trematoda, Digenea) in European freshwater snails - a checklist of records from over one hundred years. *Folia Malacologica*, **19**, 165-189. doi: 10.2478/v10125-011-0023-6.
- Ciparis, S., Iwanowicz, D. & Voshell, J.** (2013) Relationships between nutrient enrichment, pleurocerid snail density and trematode infection rate in streams. *Freshwater Biology*, **58**, 1392-1404. doi: 10.1111/fwb.12135.
- Coelho, L., Lima, W. & Guimarães, M.** (2009) Sympatric and allopatric combinations of *Lymnaea columella* and *Fasciola hepatica* from southern and south-eastern Brazil. *Journal of Helminthology*, **83**, 285-288. doi: 10.1017/S0022149X09222930.
- Combes, C. & Moné, H.** (1987) Possible mechanisms of the decoy effect in *Schistosoma mansoni* transmission. *International Journal for Parasitology*, **17**, 971-975. doi: 10.1016/0020-7519(87)90017-8.
- Cornick, J.** (1988) Gastric squamous cell carcinoma and fascioliasis in a llama. *Cornell Veterinary*, **78**, 235-241.

- Correa, A.** (2010) Analyse de l'interaction hôte-parasite sous différentes approches évolutives : le système Lymnaeidae (Gastropoda)–Fasciolidae (Trematoda). Thèse PhD, Université de Montpellier 2.
- Correa, A., Escobar, J., Durand, P., David, P., Jarne, P., Pointier, J. & Hurtrez-Boussès, S.** (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *Evolutionary Biology*, **10**, 381. doi: 10.1186/1471-2148-10-381.
- Correa, A., Escobar, J., Noya, O., Velázquez, L., González-Ramírez, C., Hurtrez-Boussès, S. & Pointier, J.** (2011) Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 1978-1988. doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.003.
- Cowie, R.** (1997) Catalog and Bibliography of the nonindigenous Nonmarine Snails and Slugs of the Hawaiian Islands. *Bishop Museum Occasional Papers*, **50**, 66p.
- Cowie, R.** (2001) Invertebrate invasions on Pacific Islands and the replacement of unique native faunas: a synthesis of the land and freshwater snails. *Biological Invasions*, **3**, 119-136.
- Cruz-Mendoza, I., Figueroa, J., Correa, D., Ramos-Martínez, E., Lecumberri-López, J. & Quiroz-Romero, H.** (2004) Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of Mexico. *Veterinary Parasitology*, **121**, 87-93. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.02.006.
- Cruz-Reyes, A. & Malek, E.** (1987) Suitability of six lymnaeid snails for infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **24**, 203-210. doi: 10.1016/0304-4017(87)90041-0.
- Cucher, M., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbé, J. & Wisnivesky-Colli, C.** (2006) PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Veterinary Parasitology*, **137**, 74-82. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.12.013.
- Cwiklinski, K., Allen, K., LaCourse, E., Williams, D. & Paterson, S.** (2015) Characterisation of a novel panel of polymorphic microsatellite loci for the liver fluke, *Fasciola hepatica*, using a next generation sequencing approach. *Infection, Genetics and Evolution*, **32**, 298-304. doi: 10.1016/j.meegid.2015.03.014.
- Dar, Y., Djuikwo, F., Vignoles, P., Dreyfuss, G. & Rondelaud, D.** (2010) *Radix natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae), a potential intermediate host of *Fasciola hepatica* in Egypt. *Parasite*, **17**, 251-256.
- Dar, Y., Lounnas, M., Djuikwo, F., Mouzet, R., Courtiou, B., Hurtrez-Boussès, S., Vignoles, P., Dreyfuss, G. & Rondelaud, D.** (2013) Variations in local adaptation of allopatric *Fasciola hepatica* to French *Galba truncatula* in relation to parasite origin. *Parasitology Research*, **112**, 2543-2549. doi: 10.1007/s00436-013-3421-4.
- Dar, Y., Vignoles, P., Rondelaud, D. & Dreyfuss, G.** (2002) *Fasciola gigantica*: the growth and larval productivity of redial generations in the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research*, **88**, 364-367. doi: 10.1007/s00436-001-0552-9.
- de Meeûs, T., McCoy, K., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S. & Renaud, F.** (2007) Population genetics and molecular epidemiology or how to "de'busquer la bête". *Infection, Genetics and Evolution*, **7**, 308-332. doi: 10.1016/j.meegid.2006.07.003.
- Degueurce, F., Abrous, M., Dreyfuss, G., Rondelaud, D. & Gevrey, J.** (1999) *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the prevalence of natural or experimental infections in four species of freshwater snails in eastern France. *Journal of Helminthology*, **73**, 197-202.
- Díaz, R., Garcés, M., Millán, L., Pérez, J. & Millán, J.** (2011) Comportamiento clínico-terapéutico de *Fasciola hepatica* en una serie de 87 pacientes. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **63**, 268-274.
- Dillon, R.** (2000) *The Ecology of Freshwater Molluscs*. 509 pp. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Dinnik, J. & Dinnik, N.** (1961) On the morphology, and life history of *Fasciola nyanzae* Leiper, 1910 from the hippopotamus. *Journal of Helminthology*, **65**, 53-62. doi: 10.1017/S0022149X00017570.
- Dreyfuss, G., Abrous, M., Vignoles, P. & Rondelaud, D.** (2004) *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: vertical distribution of metacercariae on plants under natural conditions. *Parasitology Research*, **94**, 70-73. doi: 10.1007/s00436-004-1173-x.

- Dreyfuss, G., Alarion, N., Vignoles, P. & Rondelaud, D.** (2006) A retrospective study on the metacercarial production of *Fasciola hepatica* from experimentally infected *Galba truncatula* in central France. *Parasitology Research*, **98**, 162-166. doi: 10.1007/s00436-005-0048-0.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P. & Rondelaud, D.** (2000) Variability of *Fasciola hepatica* infection in *Lymnaea ovata* in relation to snail population and snail age. *Parasitology Research*, **86**, 69-73.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P. & Rondelaud, D.** (2003) Natural infections of *Omphiscola glabra* (Lymnaeidae) with *Fasciola hepatica* in central France. *Parasitology Research*, **91**, 458-491. doi: 10.1007/s00436-003-0892-8.
- Dreyfuss, G., Vignoles, P. & Rondelaud, D.** (2005) *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitology Research*, **95**, 278-282. doi: 10.1007/s00436-004-1269-3.
- Duffy, T., Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Issia, L., Schijman, A. & Wisnivesky-Colli, C.** (2009) Real-time PCR strategy for rapid discrimination among main lymnaeid species from Argentina. *Acta Tropica*, **109**, 1-4.
- Durand, P., Pointier, J., Escoubeyrou, K., Arenas, J., Yong, M., Amarista, M., Bargues, M., Mas-Coma, S. & Renaud, F.** (2002) Occurrence of a sibling species complex within neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Acta Tropica*, **83**, 233-240.
- Dybdahl, M. & Storfer, A.** (2003) Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 523-530. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00223-4.
- Emmanuel, N., Loha, N., Ojogba, O. & Ikenna, O.** (2011) Landscape epidemiology: An emerging perspective in the mapping and modelling of disease and disease risk factors. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 247-250.
- Espino, A., Díaz, A., Pérez, A. & Finlay, C.** (1998) Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human *Fasciola hepatica* outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 2733-2726.
- Espinosa, J. & Ortea, J.** (2009) *Moluscos Terrestres de Cuba*. 191 pp. Vasa, Finlandia, UPC Print.
- Esteban, J., Flores, A., Aguirre, C., Strauss, W., Anglés, R. & Mas-Coma, S.** (1997) Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, **66**, 1-14.
- Esteban, J., González, C., Curtale, F., Muñoz-Antoli, C., Valero, M., Bargues, M., El Sayed, M., El Wakeel, A., Abdel-Wahab, Y., Montresor, A., Engels, D., Savioli, L. & Mas-Coma, S.** (2003) Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis villages in the Nile Delta of Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **69**, 429-437.
- Estoup, A. & Martin, O.** (1996) Marqueurs microsatellites: isolement à l'aide de sondes non-radioactives, caractérisation et mise au point [WWW document]. <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm> [accessed on 23 September 2015].
- FAO** (2003) Veterinary public health and control of zoonoses in developing countries. In *Summary of comments and discussions from the FAO/WHO/OIE electronic conference*. Rome.
- Fernández-Calienes, A., Fraga, J., Pointier, J., Yong, M., Sánchez, J., Coustau, C., Gutiérrez, A. & Théron, A.** (2004) Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica*, **92**, 83-87. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.05.014.
- Ferrer, J., Perera, G. & Yong, M.** (1985) Estudio de los moluscos fluviales de una localidad afectada por un brote de fascioliasis. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **37**, 155-160.
- Ferrer, J., Perera, G., Yong, M. & Amador, O.** (1989) Estudios de densidad de hospederos intermedios de enfermedades tropicales en berreras. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **41**, 341-354.
- Foreyt, W. & Todd, A.** (1978) Experimental Infection of Lymnaeid Snails in Wisconsin with Miracidia of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology*, **64**, 1132-1134.
- Frandsen, F. & Christensen, N.** (1984) An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, **41**, 181-202.
- Fried, B. & Abruzzi, A.** (2010) Food-borne trematode infections of humans in the United States of America. *Parasitology Research*, **106**, 1263-1280. doi: 10.1007/s00436-010-1807-0.

- Fuentes, M.** (2006) Remote sensing and climate data as a key for understanding fasciolosis transmission in the Andes: review and update of an ongoing interdisciplinary project. *Geospatial Health*, **1**, 59-70.
- Gandon, S. & Michalakis, Y.** (2002) Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**, 451-462.
- Gandon, S. & van Zandt, P.** (1998) Local adaptation and host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 214-216.
- Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, Y., Michalakis, Y. & Olivieri, I.** (1996) Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society London B*, **263**, 1003-1009.
- Garcia, D.** (2009) Biologie des populations vectrices de fasciolose et organisation des réseaux hydrographiques. Thèse Master 2, Université de Montpellier 2.
- Gasnier, N., Rondelaud, D., Abrous, M., Carreras, F., Boulard, C., Diez-Baños, P. & Cabaret, J.** (2000) Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *International Journal for Parasitology*, **30**, 573-578.
- González, R., Pérez Ruano, M. & Brito, S.** (2007) Fasciolosis bovina. Evaluación de las principales pérdidas provocadas en una empresa ganadera. *Revista de Salud Animal*, **29**, 167-175.
- Goudet, J.** (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. <<http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>>.
- Goumghar, M., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., Benlemlih, M. & Cabaret, J.** (2001) More efficient allopatric combinations of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* due to modification of radial development? *Parasitology Research*, **87**, 1016-1019.
- Goumghar, M., Vignoles, P., Rondelaud, D., Dreyfuss, G. & Benlemlih, M.** (2004) Relations entre l'amphibiase de *Galba truncatula* (Mollusca Gastropoda: Lymnaeidae), l'altitude et la nature de ses habitats dans le centre du Maroc. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **155**, 97-103.
- Grabner, D., Mohamed, F., Nachev, M., Méabed, E., Sabry, A. & Sures, B.** (2014) Invasion Biology Meets Parasitology: A Case Study of Parasite Spill-Back with Egyptian *Fasciola gigantica* in the Invasive Snail *Pseudosuccinea columella*. *PLoS ONE*, **9**, e88537. doi: 10.1371/journal.pone.0088537.
- Grétillat, S.** (1966) *Lymnaea cubensis* Pfeiffer 1911, intermediate mollusc host of *Fasciola hepatica* L., 1858 in Martinique. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, **262**, 2736-2739.
- Gürelly, G. & Göçmen, B.** (2007) Natural Infection of *Helix aspersa* (Mollusca: Pulmonata) by Dicrocoeliidae (Digenea) Larval Stages in Izmir, Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **31**, 150-153.
- Gutiérrez, A.** (2004) Intéractions Hôtes/Parasites dans le modèle *Fasciola/Lymnaeidae*: aspects dynamiques et génétiques. Thèse PhD, Université de Perpignan.
- Gutiérrez, A., Hernández, D. & Sánchez, J.** (2005b) Variation of snail's abundance in two water bodies harboring strains of *Pseudosuccinea columella* resistant and susceptible to *Fasciola hepatica* miracidial infection, in Pinar del Río Province, Cuba. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 725-727.
- Gutiérrez, A., Perera, G., Yong, M. & Wong, L.** (2001) The Effect of Isolation on the Life-history Traits of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae). *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**, 577-581.
- Gutiérrez, A., Perera, G., Yong, M., Sánchez, J. & Wong, L.** (2000) Life-history Traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under Experimental Exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **95**, 747-752.
- Gutiérrez, A., Pointier, J., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Pérez, R., Yong, M., Sánchez, J., Loker, E. & Théron, A.** (2003a) *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Experimental Parasitology*, **105**, 211-218. doi: 10.1016/j.exppara.2003.12.006.

- Gutiérrez, A., Pointier, J., Yong, M., Sánchez, J. & Théron, A.** (2003b) Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. *Parasitology Research*, **90**, 129-134. doi: 10.1007/s00436-002-0824-z.
- Gutiérrez, A., Vázquez, A., Hevia, Y., Sánchez, J., Correa, A., Hurtrez-Boussès, S., Pointier, J. & Théron, A.** (2011) First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. *Journal of Helminthology*, **85**, 109-111. doi: 10.1017/S0022149X10000350.
- Gutiérrez, A., Yong, M., Perera, G., Sánchez, J. & Théron, A.** (2002) *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea): its effect on the life history traits of *Pseudosuccinea columella* (Gasteropoda: Lymnaeidae), an uncommon interaction. *Parasitology Research*, **88**, 535-539. doi: 10.1007/s00436-002-0625-4.
- Gutiérrez, A., Yong, M., Sánchez, J., Wong, L. & Pointier, J.** (2005a) Competition between *Fossaria cubensis* and two isolates (susceptible and resistant to *Fasciola hepatica*) of *Pseudosuccinea columella* under laboratory conditions. *Haliotis*, **35**, 1-11.
- Hamed, N., Hammami, H., Khaled, S., Rondelaud, D. & Ayadi, A.** (2009) Natural infection of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae) in *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae) in northern Tunisia. *Journal of Helminthology*, **83**, 271-273. doi: 10.1017/S0022149X08207947.
- Hamilton, W., Axelrod, R. & Tanese, R.** (1990) Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (A Review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3566-3573.
- Haridy, F. & Morsy, T.** (2000) Camel: a new Egyptian host for *Fasciola gigantica*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **30**, 451-454.
- Haridy, F., Ibrahim, B., Morsy, T. & El-Sharkawy, I.** (1999) Fascioliasis an increasing zoonotic disease in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **29**, 35-48.
- Haridy, F., Morsy, G., Abdou, N. & Morsy, T.** (2002) Zoonotic fascioliasis in donkeys: ELISA (Fges) and post-mortem examination in the Zoo, Giza, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **37**, 1101-1110.
- Hartl, D. & Clark, A.** (1997) *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc.
- Haseeb, A., el-Shazly, A., Arafa, M. & Morsy, A.** (2002) A review on fascioliasis in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **32**, 317-354.
- Hawley, D. & Altizer, S.** (2011) Disease ecology meets ecological immunology: understanding the links between organismal immunity and infection dynamics in natural populations. *Functional Ecology*, **25**, 48-60. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01753.x.
- Heneberg, P.** (2013) Phylogenetic data suggest the reclassification of *Fasciola jacksoni* (Digenea: Fasciolidae) as *Fascioloides jacksoni* comb. nov. *Parasitology Research*, **112**, 1679-1689. doi: 10.1007/s00436-013-3326-2.
- Hickman, C., Roberts, L. & Larson, A.** (2001) *Integrated principles of Zoology*, Eleventh edn. 899 pp. New York, USA, McGraw-Hill.
- Hoffman, W.** (1930) The Intermediate Host of *Fasciola hepatica* in Porto Rico. *Porto Rico Journal of Public Health & Tropical Medicine*, **6**, 89-90.
- Hubendick, B.** (1951) Recent Lymnaeidae, their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, **4**, 1-223.
- Hurlbert, S.** (1972) The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, **52**.
- Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guégan, J., Meunier, C., Bargues, M., Mas-Coma, S. & Renaud, F.** (2004) Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Molecular Ecology*, **4**, 689-690. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00786.x.
- Hurtrez-Boussès, S., Hurtrez, J., Turpin, H., Durand, C., Durand, P., de Meeùs, T., Meunier, C. & Renaud, F.** (2010) Hydrographic network structure and population genetic differentiation in a vector of fasciolosis, *Galba truncatula*. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**, 178-183. doi: 10.1016/j.meegid.2010.01.005.

- Hurtrez-Boussès, S., Meunier, C., Durand, C. & Renaud, F.** (2001) Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection*, **3**, 841-849.
- Hurtrez-Boussès, S., Pendino, A., Bernabé, C., Durand, P., Rondelaud, D., Durand, C., Meunier, C., Hurtrez, J. & Renaud, F.** (2006) Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 1643-1648.
- Huson, D. & Bryant, D.** (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 254-267.
- IMV** (2013) Informe Anual del Instituto de Medicina Veterinaria. La Habana, Cuba, Ministerio de Agricultura.
- Jarne, P., Pointier, J., David, P. & Koene, J.** (2010) Basommatophoran Gastropods. In *The Evolution of "Primary" Sexual Characters in Animals* JL, L. & Córdoba-Aguilar, A. (Eds.). New York, USA, Oxford University Press, Inc.
- Johachim, H., Little, T. & Ebert, D.** (2001) Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, **55**, 1136-1145.
- Johnson, P. & Thieltges, D.** (2010) Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 961-970.
- Johnson, P., Bogan, A., Brown, K., Burkhead, N., Cordeiro, J., Garner, J., Hartfield, P., Lepitzkin, D., Mackie, G., Pip, E., Tarpley, T., Tiemann, J., Whelan, N. & Strong, E.** (2013) Conservation Status of Freshwater Gastropods of Canada and the United States. *Fisheries*, **38**, 246-282.
- Jokela, J. & Lively, C.** (1995) Spatial variation in infection by digenetic trematodes in a population of freshwater snails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Oecologia*, **103**, 509-517.
- Jones, A., Bray, R. & Gibson, D.** (2005) *Keys to the Trematoda*. 768 pp. London, UK, CABI Publishing Series.
- Kaplan, R., Dame, J., Reddy, G. & Courtney, C.** (1997) The Prevalence of *Fasciola hepatica* in its Snail Intermediate Host Determined by DNA Probe Assay. *International Journal for Parasitology*, **27**, 1585-1593.
- Kaset, C., Eursiththichai, V., Vichasri-Grams, S., Viyanant, V. & Grams, R.** (2010) Rapid identification of lymnaeid snails and their infection with *Fasciola gigantica* in Thailand. *Experimental Parasitology*, **126**, 482-488. doi: 10.1016/j.exppara.2010.05.021.
- Kearn, G.** (1998) *Parasitism and the platyhelminths*. 544 pp. London, UK, Chapman and Hall.
- Kendall, S. & Ollerenshaw, C.** (1963) The effect of nutrition on the growth of *Fasciola hepatica* in its snail host. *Proceedings of the Nutrition Society*, **22**, 41-46.
- Kendall, S.** (1949) Nutritional factors affecting the rate of development of *Fasciola hepatica* in *Limnaea truncatula*. *Journal of Helminthology*, **23**, 179-190.
- Kerr, A.** (2013) Annotated Checklist of the Aquatic snails of the Mariana Islands, Micronesia. *University of Guam Marine Laboratory Technical Report*, **147**, 26p.
- Kleiman, F., Pietrovsky, S., Paraense, W. & Wisnivesky-Colli, C.** (2004) Southernmost Finding of *Lymnaea viatrix* Orbigny, 1835 (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate Host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea), in Urban and Rural Areas of Patagonia, Argentina. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**, 23-24.
- Kleiman, F., Pietrovsky, S., Prepelitchi, L., Carbajo, A. & Wisnivesky-Colli, C.** (2007) Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. *Veterinary Parasitology*, **145**, 274-286. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.12.020.
- Knapp, S., Dunkel, A., Han, K. & Zimmerman, L.** (1992) Epizootiology of fascioliasis in Montana. *Veterinary Parasitology*, **42**, 241-246.
- Kock, K., Wolmarans, C. & Bornman, M.** (2003) Distribution and habitats of the snail *Lymnaea truncatula*, intermediate host of the liver fluke *Fasciola hepatica*, in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, **74**, 117-122.
- Kourí, P. & Arenas, R.** (1931) Dos casos autóctonos de Distomatosis hepática humana producida por la *Fasciola hepatica*. *Vida Nueva*, **28**, 389-451.

- Kourí, P.** (1940) Diagnóstico, epidemiología y profilaxis de la fascioliasis hepática humana en Cuba. *Revista Kuba de Medicina Tropical y Parasitología*, **4**, 77-79.
- Larrea, H., Oviedo, M. & Huaman, P.** (1994) Estudio anatómico de *Lymnaea diaphana* King, 1830, agente transmisor de la fascioliasis en la zona sur del Perú. *Boletín de Lima*, **16**, 95-100.
- Liese, B., Rosemburg, M. & Schratz, A.** (2010) Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. *Lancet*, **375**, 67-76.
- Lively, C.** (1987) Evidence from a New Zealand snail for the maintenance of sex by parasitism. *Nature*, **328**, 519-521.
- Lotfy, W., Brant, S., DeJong, R., Le, T., Demiaszkiewicz, A., Rajapakse, R., Perera, V., Laursen, J. & Loker, E.** (2008) Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**, 248-255.
- MacArthur, R. & Wilson, E.** (1967) *The Theory of Island Biogeography*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press.
- Madsen, H. & Frandsen, F.** (1989) The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, **46**, 139-146.
- Magalhães, K., Jannotti, L. & dos Santos, O.** (2004) Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**, 421-424.
- Magalhães, K., Jannotti-Passos, L., Caldeira, R., Aires, M., Muller, G., Carvalho, O. & Lenzi, E.** (2008) Isolation and detection of *Fasciola hepatica* DNA in *Lymnaea viatrix* from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR. *Veterinary Parasitology*, **152**, 333-338. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.019.
- Mage, C., Bourgne, H., Toullieu, J., Rondelaud, D. & Dreyfuss, G.** (2002) *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Veterinary Research*, **33**, 439-447.
- Magurran, A. & McGill, B.** (2010) *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment*. Oxford University Press.
- Malek, E. & Cogswell, F.** (1980) *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* in Colombia. *The Nautilus*, **94**, 112-114.
- MapInfo Corporation.** (2011) MapInfo Corporation. MapInfo. v11.0. Pitney Bowes Software Inc.
- Marques, P., Caldeira, R., Bernadete, M., Zech, P., Aires, M., Müller, G. & dos Santos, O.** (2006) Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Acta Tropica*, **97**, 339-345. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.01.003.
- Mas-Coma, S.** (2005) Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology*, **79**, 207-216. doi: 10.1079/JOH2005296.
- Mas-Coma, S., Bargues, M. & Valero, M.** (2005) Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **35**, 1255-1278. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.010.
- Mas-Coma, S., Fons, R., Feliu, C., Bargues, M., Valero, M. & Galan-Puchades, M.** (1987) Conséquences des phénomènes liés à l'insularité dans les maladies parasitaires. La grande douve du foie (*Fasciola hepatica*) et les Muridés en Corse. *Bull Soc Neuchatel Sci Nat*, **110**, 57-62.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A. & Bargues, M.D.** (2009) *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Advances in Parasitology*, **69**, 41-146. doi: 10.1016/S0065-308X(09)69002-3.
- McConville, M., Brennan, G., McCoy, M., Castillo, R., Hernández-Campos, A., Ibarra, F. & Fairweather, I.** (2006) Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to in vitro treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology*, **133**, 195-208. doi: 10.1017/S0031182006000114.

- Mekroud, A., Benakhla, A., Vignoles, P., Rondelaud, D. & Dreyfuss, G.** (2004) Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep, and the host snail (*Galba truncatula*) in north-eastern Algeria. *Parasitology Research*, **92**, 502-505. doi: 10.1007/s00436-004-1072-1.
- Mekroud, A., Titi, A., Benakhla, A., Vignoles, P. & Rondelaud, D.** (2006) *Fasciola hepatica* : sensibilité des *Galba truncatula* du nord-est algérien à l'infestation expérimentale avec des miracidiums sympatriques. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **157**, 494-501.
- Ménard, A., Agoulon, A., L'Hostis, M., Rondelaud, D., Collard, S. & Chauvin, A.** (2001) *Myocastor coypus* as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France. *Veterinary Research*, **32**, 499-508.
- Ménard, A., L'Hostis, M., Leray, G., Marchandea, S., Pascal, M., Roudot, N., Michel, V. & Chauvin, A.** (2000) Inventory of wild rodents and lagomorphs as natural hosts of *Fasciola hepatica* on a farm located in a humid area in Loire Atlantique (France). *Parasite*, **7**, 77-82.
- Mera y Sierra, R., Artigas, P., Cuervo, P., Deis, E., Sidoti, L., Mas-Coma, S. & Bargues, M.D.** (2009) Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Veterinary Parasitology*, **166**, 73-79. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.08.001.
- Meunier, C.** (2002) Fonctionnement des populations hôtes et adaptation au parasite dans l'interaction limnée-douve (Mollusque-Trématode). Thèse PhD, Université de Montpellier 2.
- Meunier, C., Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Rondelaud, D. & Renaud, F.** (2004b) Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Ecology*, **13**, 2535-2543. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02242.x.
- Meunier, C., Hurtrez-Boussès, S., Jabbour-Zahab, R., Durand, P., Rondelaud, D. & Renaud, F.** (2004a) Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity*, **92**, 316-322. doi: 10.1038/sj.hdy.6800410.
- Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Bargues, M., Mas-Coma, S., Pointier, J., Jourdane, J. & Renaud, F.** (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular Ecology*, **10**, 1333-1340.
- Molloy, J. & Anderson, G.** (2006) The distribution of *Fasciola hepatica* in Queensland, Australia, and the potential impact of introduced snail intermediate hosts. *Veterinary Parasitology*, **137**, 62-66. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.12.024.
- Molyneux, D. & Malecela, M.** (2011) Neglected Tropical Diseases and the Millennium Development Goals-why the "other diseases" matter: reality versus rhetoric. *Parasites & Vectors*, **4**, 234.
- Morales, G. & Pino, I.** (1983) Infection of *Lymnaea cubensis* by *Fasciola hepatica* in a high altitude region in Venezuela. *Ann. Parasitol. Hum. comp.*, **58**, 27-30.
- Nei, M.** (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106**, 283-292.
- Nei, M.** (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 583-590.
- Neyra, V., Chavarry, E. & Espinoza, J.** (2002) Cysteine proteinases Fas1 and Fas2 are diagnostic markers for *Fasciola hepatica* infection in alpacas (*Lama pacos*). *Veterinary Parasitology*, **105**, 21-32.
- Nguyen, T., Le, T., Dao, T., Tran, T., Praet, N., Speybrouck, N., Vercruyse, J. & Dorny, P.** (2011) Bovine fasciolosis in the human fasciolosis hyperendemic Binh Dinh province in central Vietnam. *Acta Tropica*, **117**, 19-22.
- Nicot, A., Dubois, M., Debain, C., David, P. & Jarne, P.** (2008) Characterization of 15 microsatellite loci in the pulmonate snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Molecular Ecology*, **8**, 1281-1284. doi: 10.1111/j.1755-0998.2007.02065.x.
- Novobilský, A., Kašný, M., Beran, L., Rondelaud, D. & Höglund, J.** (2013) *Lymnaea palustris* and *Lymnaea fuscus* are potential but uncommon intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Sweden. *Parasites & Vectors*, **6**, 251.
- Nuismer, S. & Otto, S.** (2005) Host-parasite interactions and the evolution of gene expression. *PLoS Biology*, **3**, 1283-1288. doi: 10.1371/journal.pbio.0030203.

- Ollerenshaw, C.** (1971) Forecasting liver fluke disease in England and Wales 1958-1968 with a comment on the influence of climate on the incidence of the disease in some other countries. *Vet. Med. Rev.*, **2/3**, 289-312.
- Olsen, W.** (1944) Bionomics of the lymnaeid snail, *Stagnicola bulimoides techella*, the intermediate host of the liver fluke in Southern Texas. *Journal of Agricultural Research*, **69**, 389-403.
- Osnas, E. & Lively, C.** (2011) Parasite dose, prevalence of infection and local adaptation in a host-parasite system. *Parasitology Research*, **109**, 675-687.
- Paraense, W.** (1983) Lymnaea columella in northern Brazil. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **78**, 477-482.
- Pavlovski, E.** (1966) *The Natural Nidality of Transmissible Disease*. Urbana, University of Illinois Press.
- Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J., Pedreira, J., Arias, M., López, C., Panadero, R., Díaz, P., Díez-Baños, P. & Morrondo, P.** (2003) Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research*, **91**, 328-331. doi: 10.1007/s00436-003-0961-z.
- Perera, G.** (1996) Ecologie des mollusques d'eau douce d'intérêt médical et vétérinaire à Cuba. Thèse PhD, Université de Perpignan.
- Perera, G., Yong, M. & Ferrer, J.** (1991) Control biológico de *Fossaria cubensis*, hospedero intermediario de *Fasciola hepatica*, en 2 localidades con diferentes agentes de control. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **43**, 17-20.
- Perera, G., Yong, M. & Ferrer, J.** (1993) Biological control of snail intermediate hosts by competitor thiariid snails in Cuba. *Journal of Medical and Applied Malacology*, **5**, 97-101.
- Periago, M., Valero, M., El Sayed, M., Ashrafi, K., El Wakeel, A., Mohamed, M., Desquesnes, M., Curtale, F. & Mas-Coma, S.** (2008) First phenotypic description of *Fasciola hepatica/Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**, 51-58.
- Petitclerc, M. & Barré, N.** (1986) Note on a focus of *Fasciola hepatica* L. 1758 in Guadeloupe (French West Indies). *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **39**, 203-205.
- Pfeiffer, L.** (1839) Bericht über die Ergebnisse meine Reise nach Kuba im Winter 1838-1839. *Archiv für Naturgeschichte*, **6**, 25-261.
- Poey, F.** (1858) Memorias sobre la Historia natural de la Isla de Cuba, 2.
- Pointier, J. & Jourdane, J.** (2000) Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. *Acta Tropica*, **77**, 53-60.
- Pointier, J. & Marquet, G.** (1990) Taxonomy and distribution of freshwater mollusks of French Polynesia. *The Japanese Journal of Malacology*, **48**, 147-160.
- Pointier, J. & Théron, A.** (1979) La schistosomose intestinale dans les fôrets marécageuses à *Pterocarpus* de Guadeloupe (Antilles françaises). Ecologie du vecteur, *Biomphalaria glabrata* et de son parasite *Schistosoma mansoni*. *Annales de Parasitologie*, **54**, 43-56.
- Pointier, J.** (2008) *Guide to the Freshwater Molluscs of the Lesser Antilles*. 128 pp. Hackenheim, Germany, ConchBooks.
- Pointier, J., Coustau, C., Rondelaud, D. & Théron, A.** (2007) *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitology Research*, **101**, 1389-1392. doi: 10.1007/s00436-007-0656-y.
- Pointier, J., David, P. & Jarne, P.** (2005) Biological invasions: the case of planorbid snails. *Journal of Helminthology*, **79**, 249-256. doi: DOI: 10.1079/JOH2005292.
- Pointier, J., Noya, O., Alarcón de Noya, B. & Théron, A.** (2009) Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* in Venezuela. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104**, 790-796.
- Pointier, J., Noya, O., Amarista, M. & Théron, A.** (2004) *Lymnaea cousinsi* Jousseaume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae): First record for Venezuela. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**.
- Pointier, J.-P., Yong, M. & Gutiérrez, A.** (2005) *Guide to the freshwater mollusks of Cuba*. 120 pp. Hackenheim, Conchbooks.
- Polley, L. & Thompson, R.** (2009) Parasite zoonoses and climate change: molecular tools for tracking shifting boundaries. *Trends in Parasitology*, **25**, 285-291. doi: 10.1016/j.pt.2009.03.007.

- Pouslednik, L.** (2006) Systematics of the Australasian Lymnaeidae. Thèse PhD, University of Wollongon.
- Prepelitchi, L., Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Moriena, R., Racioppi, O., Alvarez, J. & Wisnivesky-Colli, C.** (2003) First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Prepelitchi, L., Pietrokovsky, S., Kleiman, F., Rubel, D., Issia, L., Moriena, R., Racioppi, O., Alvarez, J. & Wisnivesky, C.** (2011) Population Structure and Dynamics of *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Gastropoda: Lymnaeidae) in Wetlands of Northeastern Argentina. *Zoological Studies*, **50**, 164-176.
- Prugnolle, F., de Meeûs, T., Pointier, J., Durand, P., Rognon, A. & Théron, A.** (2006) Geographical variations in infectivity and susceptibility in the host-parasite system *Schistosoma mansoni/Biomphalaria glabrata*: no evidence for local adaptation. *Parasitology*. doi: 10.1017/S0031182006000412.
- Pullan, N. & Whitten, L.** (1972) Liver fluke *Fasciola hepatica* in New Zealand, Part 1. A spreading parasite in sheep and cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, **20**, 69-72.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N. & Chevillon, C.** (2001) Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? In *Microevolution Rate, Pattern, Process* (pp. 287-296). Springer Netherlands. doi : 10.1007/978-94-010-0585-2\_18.
- Raymond, M., Callaghan, A., Fort, P. & Pasteur, N.** (1991) Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, **350**, 151-153.
- Relf, V., Good, B., Hanrahan, J., McCarthy, E., Forbes, A. & deWaal, T.** (2011) Temporal studies on *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*, **175**, 287-292. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.010.
- Rice, H.** (1984) Analysing tables of statistical Tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Rognlie, M., Dimke, K., Potts, R. & Knapp, S.** (1996) Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. *Veterinary Parasitology*, **65**, 297-305.
- Rojas, L., Vázquez, A., Domenech, I. & Robertson, L.** (2010) Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends in Parasitology*, **26**, 26-34. doi: 10.1016/j.pt.2009.10.005.
- Rokni, M., Mirhendi, H., Mizani, A., Mohebali, M., Sharbatkhori, M., Kia, E., Abdoli, H. & Izadi, S.** (2010) Identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using a simple PCR-restriction enzyme method. *Experimental Parasitology*, **124**, 209-213.
- Roman, J. & Darling, J.** (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**, 454-564. doi: 10.1016/j.tree.2007.07.002.
- Rondelaud, D., Belfaiza, M., Vignoles, P., Moncef, M. & Dreyfuss, G.** (2009) Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. *Journal of Helminthology*, **83**, 245-254. doi: 10.1017/S0022149X09222528.
- Rondelaud, D., Hourdin, P., Vignoles, P. & Dreyfuss, G.** (2005) The contamination of wild watercress with *Fasciola hepatica* in central France depends on the ability of several lymnaeid snails to migrate upstream towards the beds. *Parasitology Research*, **95**, 305-309. doi: 10.1007/s00436-004-1283-5.
- Rondelaud, D., Hourdin, P., Vignoles, P., Dreyfuss, G. & Cabaret, J.** (2011) The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. *Veterinary Parasitology*, **181**, 166-173. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.056.
- Rondelaud, D., Vignoles, P. & Dreyfuss, G.** (2009b) La Limnée tronquée, un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire. *PULIM*, Limoges., p 283.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Dreyfuss, G. & Mage, C.** (2006) The control of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) by the terrestrial snail *Zonitoides nitidus* on acid soils. *Biological Control*, **39**, 290-299. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.07.015.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Vareille-Morel, C., Abrous, M., Mage, C. & Mouzet, R.** (2004) *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: field observations on the transport and

- outcome of floating metacercariae in running water. *Journal of Helminthology*, **78**, 173-177. doi: 10.1079/JOH2003215.
- Rousset, F.** (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.
- Sánchez, R., Perera, G. & Sánchez, J.** (1995) Cultivo de *Fossaria cubensis* (Pfeiffer) (Pulmonata: Lymnaeidae) hospedero intermedio de *Fasciola hepatica* (Linnaeus) en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **47**, 71-73.
- Sandland, G. & Minchella, D.** (2003) Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak? *Trends in Parasitology*, **19**, 571-574.
- Schulte, R., Makus, C. & Schulemburg, H.** (2013) Host-parasite coevolution favours parasite genetic diversity and horizontal gene transfer. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**, 1836-1840. doi: 10.1111/jeb.12174.
- Secretaría de la Convención de Ramsar** (2006) *Manual de la Convención de Ramsar. Guía a la Convención sobre los Humedales (Ramsar, Irán, 1971)*, 4ta edn. Gland, Suiza, Secretaría de la Convención de Ramsar.
- Shimalov, V. & Shimalov, V.** (2000) Findings of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 in wild animals in Belorussian Polesie. *Parasitology Research*, **86**, 527.
- Shuman, E.** (2010) Global Climate Change and Infectious Diseases. *The New England Journal of Medicine*, **362**, 1061-1063.
- Simpson, E.** (1949) Measurement of diversity. *Nature*, **163**, 688.
- Sire, C., Durand, P., Pointier, J. & Théron, A.** (2001) Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*): infrapopulation differentiation at microspatial scale. *International Journal for Parasitology*, **31**, 1609-1616.
- Souza, C., Magalhães, K., Jannotti-Passos, L., dos Santos, G., Ribeiro, F. & Katz, N.** (2002) Aspects of the Maintenance of the Life Cycle of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 407-410.
- Spratt, D. & Presidente, P.** (1981) Prevalence of *Fasciola hepatica* infection in native mammals in southeastern Australia. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences*, **59**, 713-721.
- Standley, C., Prepelitchi, L., Pietrokovsky, S., Issia, L., Stothard, J. & Wisnivesky, C.** (2013) Molecular characterization of cryptic and sympatric lymnaeid species from the *Galba/Fossaria* group in Mendoza Province, Northern Patagonia, Argentina. *Parasites & Vectors*, **6**, 304.
- StatSoft, Inc.** (2008) STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Suhardono, Roberts, J. & Copeman, D.** (2006) Biological control of *Fasciola gigantica* with *Echinostoma revolutum*. *Veterinary Parasitology*, **140**, 166-170. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.02.028.
- ter-Braak, C. & Verdonschot, P.** (1995) Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Sciences*, **57**, 255-289.
- Théron, A., Sire, C., Rognon, A., Prugnolle, F. & Durand, P.** (2004) Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology*, **129**, 571-585. doi: 10.1017/S0031182004005943.
- Thompson, J.** (1994) *The Coevolutionary Process*. Chicago, The University of Chicago Press.
- Valero, M., Panova, M., Comes, A., Fons, R. & Mas-Coma, S.** (2002) Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimental infected murid rodents. *Journal of Parasitology*, **88**, 308-313.
- Valero, M., Perez-Crespo, I., Khoubbane, M., Artigas, P., Panova, M., Ortiz, P., Maco, V., Espinoza, J. & Mas-Coma, S.** (2012) *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic areas: Valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**, 403-410. doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.009.
- van Valen, L.** (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, **1**, 1-30.

- Vaughan, J., Charles, J. & Boray, J.** (1997) *Fasciola hepatica* infection in farmed emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Australian Veterinary Journal*, **75**, 811-813.
- Vázquez, A., Sánchez, J. & Hevia, Y.** (2009) Distribución y preferencia de hábitats de moluscos hospederos intermedios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **61**, 248-253.
- Vázquez, A., Sánchez, J., Pointier, J., Théron, A. & Hurtrez-Boussès, S.** (2014) *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *Journal of Helminthology*, **88**, 434-440. doi: 10.1017/S0022149X13000382.
- Velázquez, L.** (2006) Synonymy between *Lymnaea bogotensis* Pilsbry, 1935 and *Lymnaea cousinsi* Jousseaume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae). *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 795-799.
- Vidal-Martínez, V., Pech, D., Sures, B., Purucher, S. & Poulin, R.** (2010) Can parasites really reveal environmental impact? *Trends in Parasitology*, **26**, 44-51. doi: 10.1016/j.pt.2009.11.001.
- Vignoles, P., Ménard, A., Rondelaud, D., Chauvin, A. & Dreyfuss, G.** (2001) *Fasciola hepatica*: the characteristics of experimental infections in *Lymnaea truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *Parasitology Research*, **87**, 945-949.
- Vilas, R., Vázquez-Prieto, S. & Paniagua, E.** (2012) Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: Implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**, 45-52. doi: 10.1016/j.meegid.2011.10.010.
- Vinarski, M.** (2011) A new species of stagnicoline snails (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) from the extreme North of Western Siberia. *Zootaxa*, **2817**, 55-58.
- Vinarski, M.** (2013) One, two, or several? How many lymnaeid genera are there? *Ruthenica*, **23**, 41-58.
- Vinarski, M., Grebennikov, M. & Shishkoedova, O.** (2013) Past and present distribution of *Myxas glutinosa* (O.F. Müller, 1774) in the waterbodies of the Urals and Siberia. *Journal of Limnology*, **72**, 336-342. doi: 10.4081/jlimnol.2013.e27.
- Webster, J. & Woolhouse, M.** (1999) Cost of resistance: relationship between reduced fertility and increased resistance in a snail-schistosome host-parasite system. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **266**, 391-396.
- WHO** (2007) The "neglected" neglected worms. *Actions Against Worms Newsletter*, December, 1-8.
- WHO** (2013) Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. *WHO Technical Report Series*, 152p.
- Wilson, A., Pullin, P. & Denison, J.** (1971) An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnaea truncatula*. *Parasitology*, **63**, 491-506. doi: 10.1017/S003118200008001X.
- Wilson, R. & Denison, J.** (1970) Short-chain fatty acids as stimulants of turning activity by the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **32**, 511-517.
- Wolinska, J. & King, K.** (2009) Environment can alter selection in host-parasite interactions. *Trends in Parasitology*, **25**, 236-244. doi: 10.1016/j.pt.2009.02.004.
- Yong, M. & Rodríguez, M.** (1994) Evaluación de la acción molusquicida de *Agave legrelliana* sobre *Fossaria cubensis* (Mollusca: Lymnaeidae), principal vector de fascioliasis en Cuba. *Parasitología al Día*, **18**, 46-50.
- Yong, M.** (1998) Biosystématique des mollusques d'eau douce d'intérêt médical et vétérinaire de Cuba. Thèse PhD, Université de Perpignan.
- Zarco, A., Fantozzi, M. & Cuervo, P.** (2011) Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeidae, *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817): First record in Córdoba province, central Argentina. *Check List*, **7**, 391-393.
- Żbikowska, E. & Nowak, A.** (2009) One hundred years of research on the natural infection of freshwater snails by trematode larvae in Europe. *Parasitology Research*, **105**, 301-311. doi: 10.1007/s00436-009-1462-5.



---

## Annexes – Articles insérés dans la thèse

Article 1 : accepté dans *Journal of Helminthology*

**Genetic and infective diversity of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) from Cuba**

A.A. Vázquez, M. Lounnas, J. Sánchez, A. Alba, A. Milesi and S. Hurtrez-Boussès

Article 2 : soumis à *Veterinary Parasitology*

**Unveiling snail hosts of fasciolosis: a multiplex PCR for the simultaneous identification of three cryptic *Galba* species and its application in communities from North and South America**

P. Alda\*, M. Lounnas\*, A.A. Vázquez, A. Gutiérrez, N. Uribe, A. Orlando-Nárvaez, J. Muzzio-Aroca, L. Martini, M. Celi-Erazo, O. Ayaqui, J. Arenas, F.C. Muñiz, E.S. Loker, O. Noya, L. Prepelitchi, C. Wisnivesky-Colli, P. David, J.-P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès

Article 3 : publié dans *Journal of Helminthology* (2011) 85: 109-111.

DOI: 10.1017/S0022149X10000350

**First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean**

A. Gutiérrez, A.A. Vázquez, Y. Hevia, J. Sanchez1, A.C. Correa, S. Hurtrez-Boussès, J.-P. Pointier and A. Théron

Article 4 : en préparation

**Genetic diversity of the two Lymneid snails vectors of fasciolosis in Cuba: *G. cubensis* and *Pseudosuccinea columella***

A.A. Vázquez, M. Lounnas, A. Dia, P. Alda, J. Sánchez, K. Sartori, P. David, J.-P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès

Article 5 : soumis à *Canadian Journal of Zoology*

**Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci in an intermediate host of fascioliasis, the freshwater snail *Galba cubensis* (Mollusca, Gastropoda)**

M. Lounnas, A.A. Vázquez, P. Alda, K. Sartori, R. Galzin, J.-P. Pointier, P. David, S. Hurtrez-Boussès

Article 6 : en préparation

**Ancient versus recent invasion: two genetic signatures in colonization history of a freshwater selfing snail *Galba cubensis-neotropica***

M. Lounnas, P. Alda, **A.A. Vázquez**, A. Gutiérrez, M. Yong, J. Sánchez, A.O. Narváez, J. Muzzio, V. Macias, L. Martini, O. Noya, C. Visnivesky-Colli, L. Prepelitchi, R. Ayaqui, J. Arenas, E.S. Loker, P. David, P. Jarne, J.-P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès

Article 7 : re-soumis à *Molecular Ecology*

**Clone invasion as a health threat: the case of *Pseudosuccinea columella* vector of fasciolosis**

M. Lounnas\*, A.C. Correa\*, **A.A. Vázquez**, A. Dia, J.-P. Pointier, A. Nicot, J.S. Escobar, P. David, P. Jarne, J. Arenas, R. Ayaqui, M.P. Dubois, T. Gimenez, A. Gutiérrez, C. González-Ramírez, E.S. Loker, O. Noya, L. Prepelitchi, J. Sánchez, N. Uribe, C. Visnivesky-Colli, M. Yong, S. Hurtrez-Boussès

Article 8 : publié dans *Parasitology Research* (2015) 114: 4205-4210

DOI: 10.1007/s00436-015-4653-2

**Natural prevalence in Cuban populations of the lymnaeid snail *Galba cubensis* infected with the liver fluke *Fasciola hepatica*: small values do matter**

**A.A. Vázquez**, J. Sánchez, A. Alba, J.-P. Pointier, S. Hurtrez-Boussès

Article 9 : publié dans *Journal of Helminthology* (2014) 8: 434-440

DOI: 10.1017/S0022149X13000382

***Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella***

**A.A. Vázquez**, J. Sánchez, J.-P. Pointier, A. Théron, S. Hurtrez-Boussès

Accepted for publication in *Journal of Helminthology*

**Genetic and infective diversity of the liver fluke *Fasciola hepatica*  
(Trematoda: Digenea) from Cuba**

Antonio A. Vázquez<sup>1-2\*</sup>, Manon Lounnas<sup>1</sup>, Jorge Sánchez<sup>2</sup>, Annia Alba<sup>2</sup>, Alexia Milesi<sup>1</sup>,  
Sylvie Hurtrez-Boussès<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>*MIVEGEC, UMR IRD 224 CNRS 5290 UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394*

*Montpellier Cedex 5, France*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Apartado  
Postal 601, Marianao 13, La Habana, Cuba*

<sup>3</sup>*Département de Biologie-Ecologie (Faculté des Sciences)- cc 046- Université  
Montpellier, 4 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France*

Running title: *Fasciola hepatica* diversity in Cuba

\*corresponding author: Tel.: +537-255-3626

E-mail address: [antonivp@ipk.sld.cu](mailto:antonivp@ipk.sld.cu)

## **Abstract**

In this study we present the first approach to explore the genetic diversity of Cuban *Fasciola hepatica* populations using microsatellites markers coupled with observed prevalence in slaughterhouses. Nine flukes populations recovered from cows and buffalos were studied in the central-western region of Cuba. The observed infection rates of definitive hosts (bovines) was 70-100% in most cases. An important amount of polymorphism was found in the four explored loci. However, no apparent genetic differences were found between populations from different provinces or bovine species. The absence of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium suggests high rate of cross-fertilization between *F. hepatica* individuals. This result was confirmed when all multilocus genotypes were tested for clonal reproduction and only four individuals differed statistically ( $p_{\text{sex}} < 0.05$ ). High values of expected heterozygosity coupled with highly probable mixing among strains turns the metapopulation genetically diversified but similar in terms of certain alleles (low  $F_{\text{ST}}$  values). These results suggest a close relation between parasite diversity and cattle management in Cuba. Our findings should be taken into consideration by veterinary authorities to help mitigate fasciolosis transmission.

**Key words:** liver fluke; cattle; population genetics; infection rate; management

## **Introduction**

The study of host-parasite interactions is essential to understand the dynamics of infectious diseases (Hawley & Altizer, 2011). Also, they are in fact one of the central focus of interest in evolutionary biology (Johachim *et al.*, 2001). The coevolution of this kind of interaction is considered as a reciprocal natural selection between the resistance of the host and the virulence of the parasite (Thompson, 1994). This type of selection describes how parasites are selected in a way they are capable of overcoming the resistance of their hosts. Consequently, the hosts that possess uncommon genes of resistance have a selective advantage (Hamilton *et al.*, 1990). In theory, this selective advantage, in both hosts and parasites, is favoured by the sexual reproduction which tends to produce a more genetically diversified offspring carrying resistance genes. The pass of the parasite through its hosts may drive both to suffer genetic bottlenecks resulting in a change of the genotype frequencies and thus affecting their mutual compatibility (Jarne & Théron, 2001) with a direct effect on transmission.

Fasciolosis is one of the most important remerging parasitic zoonotic diseases affecting the human population worldwide (Tolan, 2011) with an increasing impact on animal husbandry (Khan *et al.*, 2013). This parasitosis is also a concern of public health since it is considered as an important food-borne disease (Dorni *et al.*, 2009), highly endemic in regions like the Bolivian Altiplano (Valero *et al.*, 2012) or Egypt (Esteban *et al.*, 2003). Additionally, fasciolosis is regarded as the best distributed parasitosis ranging from tropical to subarctic regions (Mas-Coma *et al.*, 2009), with important prevalences known to occur also at high altitudes (Meunier *et al.*, 2001; Fuentes, 2006). This disease is caused by the helminthic species *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Both species of flukes however are included in the list of the “neglected” worms by the World Health Organization (WHO, 2007). This fact, partially caused by resources for research

being addressed towards other diseases, can be translated in higher prevalence of fasciolosis in low income countries (WHO, 2013). These parasites are transmitted by freshwater snails of the family Lymnaeidae which play an important role in the distribution and diversity of *Fasciola* spp. (Correa *et al.*, 2010). Lymnaeid snails act as intermediate hosts of the parasite where asexual reproduction of the larval stage takes place. Sexual reproduction occurs in mammals, the definitive host of *Fasciola* spp.

(Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001).

In Cuba, fasciolosis is not considered a huge public health problem (although several important outbreaks have occurred, see Rojas *et al.*, 2010 for a review) but its effect in cattle is devastating for the national economy. Only one species, *F. hepatica*, is known to occur and it is transmitted by the two species of lymnaeid snails present in Cuba, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella* (Vázquez *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2011). Previous experimental infections have shown that *G. cubensis* can be considered as the main intermediate host in the island since its populations present a higher compatibility to the different populations of the parasite tested (Vázquez *et al.*, 2014). *Pseudosuccinea columella* however seems to also play a role in the transmission since several populations proved to be experimentally compatible with *F. hepatica* and since natural infection has been reported (Gutiérrez *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2014).

Domestic definitive hosts of *F. hepatica* in Cuba are mainly bovine and ovine which are highly susceptible to become infected in the field. In some areas, antihelminthic are regularly used. These treatments are expected to cause strong bottlenecks in parasite populations and to select resistant liver flukes. Cattle in Cuba have suffered a prolonged natural selection since *Bos taurus* was first introduced by the Spaniards at early colonization stages and may have some mixture with genes from *Bos indicus* introduced from Africa (Uffo *et al.*, 2012). The introduction of *Bubalus bubalis* seems to be

originated from Australia and Trinidad and Tobago (Lesser Antilles) in early 1980s (Mitat, 2009). Infection of water buffalos by Cuban strains of *F. hepatica* could be thus considered recent compared to cows.

The infective capacity of different strains of *F. hepatica* is expected to be closely related to their genetic diversity which can turn them more/less compatible with their hosts (Dybdahl & Storfer, 2003). It has been already showed that *F. hepatica* displays an important genetic diversity that suggests a preferential outcrossing mating in its definitive hosts (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2004; Vilas *et al.*, 2012; Cwiklinski *et al.*, 2015). The use of microsatellites as genetic markers to explore the genetic structure of a given population is very convenient because of the highly polymorphism usually found in their alleles (de Meeûs *et al.*, 2007). In the case of *F. hepatica*, Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) have isolated and characterized microsatellite markers that have been useful in genetic diversity studies (Vilas *et al.*, 2012). Here we explore the population genetics of eight populations of *F. hepatica* from different regions of Cuba in order to better understand the functioning of this host/parasite system aimed at two specific questions:

(1) What are the levels of genetic diversity of Cuban liver flukes?, and (2) Do liver flukes from different geographical localities or from different definitive hosts share the same population genetic structure? This will not only contribute to enhance the knowledge of host-parasite interactions but will also help to dictate politics of cattle husbandry management in accordance to the genetic flow between populations.

## **Materials and methods**

### *Sampling of F. hepatica*

The sampling of eight populations (flukes from a particular locality) of *F. hepatica* was carried out in slaughterhouses from different regions of Cuba between 2010 and 2012.

Sampled populations were: Guane (January 2011), La Palma (two campaigns were conducted in September and December 2010), Loma Candelaria (October 2010) and Bahía Honda (September 2010) in western Cuba; Artemisa (September 2010), Jaruco (February 2012) and Santa Cruz (February 2011) in central-western Cuba; and Sagua (April 2011) in central Cuba. The infection rates at the slaughterhouses were obtained examining the totality of livers from each locality.

Adult flukes were collected alive in the liver of infected bovines and immediately stored in ethanol 80% until further analyses. For La Palma locality, sampling was only made during the campaign of September 2010. Due to constraints in the slaughterhouse, it has been impossible to obtain flukes from one definitive host of Santa Cruz and from seven hosts of Jaruco. For the other populations, we sampled at least one liver fluke per definitive host. Same fluke's population from different hosts individuals were pooled together. The populations of Artemisa, Bahía Honda, La Palma, Loma Candelaria, Guane, Santa Cruz and Sagua came from infected cows (*Bos taurus*) while the one from Jaruco was recovered from buffalos (*Bubalus bubalis*).

### *Molecular analysis*

A small piece of tissue from the posterior end of each individual (about 2 mm<sup>2</sup>) was used for DNA extraction. DNA extraction was performed following the method described by Estoup & Martin (1996), adapted for 96 wells plates. Briefly described, the

tissue from each individual was dried and placed in a single well containing 100 µL of 5% Chelex®100 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) and 5 µL of proteinase K (10mg/mL). The content on the plate was mixed in vortex and then incubated overnight at 56°C and 10 min at 95°C. The mixture was then centrifuged at 6000 xg for 6 minutes and the supernatant was collected and stored at -20°C until further analyses.

DNA extract was diluted 1/2 and used for microsatellites amplifications. Four microsatellite loci (FH15, FH23, FH25 and FH222CBP; Genbank accession numbers AJ508371, AJ508372, AJ508373 and AJ003821, respectively) were amplified through polymerase chain reaction (PCR) according to protocols described by Hurtrez-Boussès *et al.* (2004). Each locus was amplified using 2 µL of diluted DNA in a 20 µL of reaction volume containing 4 µL buffer 5x (Promega), 1.2 µL MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2 µL dNTPs 2mM (Invitro-gen/Life Technology), 1 µL of each primer (10 pmol) and 0.2 µL of *Taq* DNA Polymerase 1U (Promega). Thermocycling was performed using a MJ-Research PTC 100 96-well and consisted of 4 min of initial denaturation at 94°C, 31 cycles at 94°C, annealing temperature (FH15 = 48°C, FH23 = 50°C, FH25 = 51°C, FH222CBP = 50°C) for 30s, 30s at 72°C and a final elongation step 72°C for 10 min. Primers were fluorescently labelled to be used in an ABI automated sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA). One microliter of PCR products from each sample was diluted 1/100. A mix containing 3 µL of diluted PCR product, 0.25 µL of internal size standards (GENESCAN 500 LIZ, Applera) and 15 µL of Hi-Di Formamide (20 µL QSP) was used for automated electrophoreses. Readings of allele lengths were performed using the GeneMapper® v. 4.0 software (Applied Biosystems™).

### *Population genetics analysis*

Current parameters of population genetics like the mean number of alleles ( $a$ ), the observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_s$ ) heterozygosities, and  $F_{IS}$ , were estimated for each locus. Pairwise differentiation between populations ( $F_{ST}$ ) was also tested. Estimations were computed using the software FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001; available from <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>). Bonferroni corrections were applied for multiple tests (Rice, 1984). Identical multilocus genotypes (MLGTs) loci were identified and the probability of observing  $n$  copies of a MLGT based on random mating ( $p_{sex}$  values) was tested using GENCLONE 2.0 (Arnaud-Haond & Belkhir, 2007). Individuals with  $p_{sex}$  values statistically significant ( $p < 0.05$ ) are to be considered as a result of clonal reproduction (Vilas *et al.*, 2012). Genotypic diversity was also calculated through this software using an adapted Simpson index.

## **Results**

### *Cattle infection rates*

The infection rate observed at successive visits to the different slaughterhouses varied between 20% (Guane population) and 100% (La Palma, Loma Candelaria). Higher prevalences were observed in populations from the western province of Pinar del Río whereas values of 60-85% were found in the west-central and central region provinces (Table 1). Treatments with Triclabendazole were reported in La Palma in the second campaign (December 2010) but the shipment was found infected at more than 70%. Both studied species of bovine (cows and buffalos) were infected.

### *Population structure and genetic diversity*

All four loci resulted polymorphic in the eight studied populations. A total of 30 alleles were observed among the four studied loci (mean number of alleles per locus:  $7.5 \pm 3.7$  SD). Locus FH222CBP resulted the most polymorphic, with 12 different alleles, and locus FH25 the less polymorphic (three alleles). Any significant linkage disequilibrium was observed for all pairs of loci.

Mean number of alleles, observed ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_s$ ) and  $F_{IS}$  values per population are given in Table 2. We observed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in three populations: Bahia Honda, Loma Candeleria and Santa Cruz. However, strong deviations only concerned locus FH23 ( $F_{IS} = 1$  ( $p < 0.05$ ), 0.726 ( $p < 0.05$ ) and 1 ( $p < 0.005$ ) respectively) whereas none of the other loci presented significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. These results are consistent with those of Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) who signalled the presence of null alleles at locus FH23. We therefore re-analysed the data without locus FH23 (Table 2).

Populations were not significantly differentiated ( $F_{ST} = 0.05$ , NS). Table 3 gives  $F_{ST}$  values between pairs of populations. Practically any pair of population was significantly differentiated, excepted Guane and Artemisa (Bonferroni- adjusted probability: 0.034). Due to the presence of null alleles, we excluded locus FH23 from the computation of multilocus genotypes (MLGTs). A total of 83 MLGTs were observed among the eight studied populations using only the loci FH15, FH25, FH222CBP. The mean number of MLGTs per population was 14.87 ( $\pm 4.29$ SD) but it was found to depend of the sample size (Spearman correlation  $R = 0.781$ ,  $p = 0.012$ ). The names and number of MLGTs in each population, Simpson diversity index adapted for MLGTs and  $p_{sex}$  values statistically significant are summarized in Table 4. Genotypic diversity was found high for every population with the lowest value of 0.861 in Artemisa. We found 23 MLGTs

repeated among different populations while 60 were observed only within a single population. Only two populations (Artemisa and Santa Cruz) showed repeated MLGTs with values of  $p_{\text{sex}} < 0.05$ .

## Discussion

Although infection rates varied among samples, it is clearly noted that parasitism in Cuban bovine populations by *F. hepatica* is extended and persistent. All attempts to investigate infection in sacrificed animals at slaughterhouses were positive. However, there were no major differences in infection rates which were usually above 70% in most cases. In any case, the small differences in infection rates detected can be explained by either different ecological transmission schemes or different susceptibility/infectivity of the host/parasite system. Also, the age of definitive hosts may play an important role since older individuals are supposed to display higher infections if transmission is granted. Since the ecology of the intermediate host snails usually overlaps with that of the final hosts (bovines) (Vázquez *et al.*, 2014) transmission can be prompted and thus infection rates would become larger (Hawley & Altizer, 2011).

Different definitive host species may differ in compatibility with a particular parasite population. However, liver fluke prevalences in water buffalos were similar to those observed in cattle and  $F_{\text{ST}}$  values between buffalo population (Jaruco) and cow's populations were non-significant. This fact suggests that genetic exchanges are very common among *F. hepatica* strains circulating in Cuba. These results are consistent with those of Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) who did not find significant genetic differentiation between liver flukes infecting cow, sheep and pig. It is noteworthy that

slaughterhouses reported the cattle of being treated with Triclabendazole, which is the drug of choice for fasciolosis (Fried & Abruzzi, 2010). However, the infection rates were not zero and can actually be considered important (75%). This may indicate that some infrapopulations of *F. hepatica* (flukes inside one particular host individual) are actually avoiding the effect of the drugs probably through a resistance. Nevertheless, there were not important differences in genetic diversity between treated and untreated areas which indicate that treatment is not carried out at a large scale or properly. A decrease in the allelic diversity would be expected in the treated area through strong genetic bottlenecks which were not observed here.

The number of alleles found in the nine studied populations of *F. hepatica* from Cuba reveals a high genetic diversity, with small variation between populations. It is however noteworthy that the population that presents the smallest allele diversity (Artemisa, mean number of alleles: 3.67) is also that with smallest prevalences in definitive hosts (33.33%).

Although this species is known to shift from self-fertilization to cross-fertilization depending on the number of flukes in one liver (Hanna *et al.*, 2008), the absence of deviation from HW equilibrium observed is an indicative of a predominance of cross-fertilization (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2004; Cwiklinski *et al.*, 2015). When this reproductive strategy is coupled with an important amount of genetic flow (i.e. infected cattle movement within and between provinces) the outcome is translated into a diverse metapopulation of *F. hepatica*. Genetic diversity in this case may favour the parasite to adapt to different populations of both intermediate and definitive hosts (Gandon *et al.*, 1996; Schulte *et al.*, 2013). Besides, there is an increased probability that genetically diversified individuals may escape the effect of anthelmintic drugs such as Triclabendazole turning a particular population of the parasite resistant.

The results regarding genetic diversity are consistent with those observed by Vilas *et al.* (2012) in terms of allelic richness although our values are slightly higher. However, the heterozygosity observed in the Bolivian Altiplano by Hurtrez-Boussès *et al.* (2004) when using the same microsatellite loci was lower than those reported here for Cuban *F. hepatica*. Recently a new panel of microsatellites has been described for *F. hepatica* using samples from United Kingdom (Cwiklinski *et al.*, 2015). That study reported higher values of observed heterozygosity and sampled alleles for almost every locus than those informed here. The low value of genetic differentiation coefficient ( $G_{ST}$ ) observed in our study indicates that only 4% of genetic differences detected is explained by differences among populations. In fact,  $F_{ST}$  values between populations were only statistically significant between Artemisa and Guane which could be a result of a probable maintained isolation of these strains. This indicates that even if genetic diversity is high considering the number of alleles sampled and observed heterozygosity, it does not differ much from regions in Cuba. If we take into consideration that Cuba is a narrow island and that commerce of bovines is scanty compared to other countries, the geography factor is likely to support the fact that most *F. hepatica* populations are genetically alike. Unfortunately, we could not sample flukes from the eastern region but future works including those samples will contribute to describe the transmission in the whole country.

The number of MLGTs observed among the eight studied populations is in accordance with those obtained in Vilas *et al.* (2012) considering both sample sizes. These authors found significant multicopy MLGTs especially in sheep that were not observed in the same proportion in cattle. However, despite the fact that we only explored *F. hepatica* from cattle, in our study only two individuals from two populations can be considered the result of clonal amplification. This result reinforces the idea that sexual reproduction

is the common choice in Cuban *F. hepatica* and suggests the existence of multiple sources of contamination.

Our results suggest a close relation between parasite genetic diversity and cattle managerial activities reflected in the infection rates at studied slaughterhouses. Understanding the effect of genetic variability together with host-parasite adaptation at both intermediate and definitive hosts levels would be crucial to prevent and control fasciolosis in Cuba. Differences in compatibility between *F. hepatica* and the two lymnaeid snail species existing in Cuba have been explored and discussed (Vázquez *et al.*, 2014) revealing certain parasite populations to be more/less infective than others. These very same parasite populations are those used in this study for which genetic diversity is now unveiled. For instance, the population of Artemisa with the smallest prevalence in definitive host and with the lowest allele richness has shown by Vázquez *et al.* (2014) to be that with the better infectivity against molluscs but also with the lowest cercarial production and the lowest virulence in lymnaeid snails. Such studies will therefore help to better understand hosts-liver fluke interactions. Managers and decision makers must then take into consideration these findings to help mitigate fasciolosis emergence or re-emergence in risk areas.

## Acknowledgments

The authors would like to thanks veterinary technicians from slaughterhouses that helped in the sampling of infected bovine livers. This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (BEST grant to A.A.V.). We are thankful to two anonymous reviewers and the editor that made valuable comments which helped to improve our manuscript.

## References

- Arnaud-Haond, S. & Belkhir, K.** (2007) GenClone 2.0: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization.<<http://si-wagner.ualg.pt/ccmar/maree/software.php?soft=genclon>>.
- Correa, A., Escobar, J., Durand, P., David, P., Jarne, P., Pointier, J. & Hurtrez-Boussès, S.** (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *Evolutionary Biology*, **10**, 381. doi: 10.1186/1471-2148-10-381.
- Cwiklinski, K., Allen, K., LaCourse, E., Williams, D. & Paterson, S.** (2015) Characterisation of a novel panel of polymorphic microsatellite loci for the liver fluke, *Fasciola hepatica*, using a next generation sequencing approach. *Infection, Genetics and Evolution*, **32**, 298-304. doi: 10.1016/j.meegid.2015.03.014.
- de Meeûs, T., McCoy, K., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S. & Renaud, F.** (2007) Population genetics and molecular epidemiology or how to “de’busquer la bête”. *Infection, Genetics and Evolution*, **7**, 308-332. doi: 10.1016/j.meegid.2006.07.003.
- Dorni, P., Praet, N., Deckers, N. & Gabriel, S.** (2009) Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*, **163**, 196-206. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.026.
- Dybdahl, M. & Storfer, A.** (2003) Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 523-530. doi: 10.1016/S0169-5347(03)00223-4.
- Esteban, J., González, C., Curtale, F., Muñoz-Antoli, C., Valero, M., Bargues, M., El Sayed, M., El Wakeel, A., Abdel-Wahab, Y., Montresor, A., Engels, D., Savioli, L. & Mas-Coma, S.** (2003) Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis villages in the Nile Delta of Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **69**, 429-437.
- Estoup, A. & Martin, O.** (1996) Marqueurs microsatellites: isolement à l'aide de sondes non-radioactives, caractérisation et mise au point [WWW document]. <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm> [accessed on 23 September 2004].

**Fried, B. & Abruzzi, A.** (2010) Food-borne trematode infections of humans in the United States of America. *Parasitology Research*, **106**, 1263-1280. doi: 10.1007/s00436-010-1807-0.

**Fuentes, M.** (2006) Remote sensing and climate data as a key for understanding fasciolosis transmission in the Andes: review and update of an ongoing interdisciplinary project. *Geospatial Health*, **1**, 59-70.

**Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, Y., Michalakis, Y. & Olivieri, I.** (1996) Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society London B*, **263**, 1003-1009.

**Goudet, J.** (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. <<http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>>.

**Gutiérrez, A., Vázquez, A., Hevia, Y., Sánchez, J., Correa, A., Hurtrez-Boussès, S., Pointier, J. & Théron, A.** (2011) First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. *Journal of Helminthology*, **85**, 109-111. doi: 10.1017/S0022149X10000350.

**Hamilton, W., Axelrod, R. & Tanese, R.** (1990) Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (A Review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3566-3573.

**Hanna, R., Edgar, H., Moffett, D., McConnell, S., Fairweather, I., Brennan, G., Trudgett, A., Hoey, E., Cromie, L., Taylor, S. & Daniel, R.** (2008) *Fasciola hepatica*: Histology of the testis in egg-producing adults of several laboratory-maintained isolates of flukes grown to maturity in cattle and sheep and in flukes from naturally infected hosts. *Veterinary Parasitology*, **157**, 222-234. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.07.022.

**Hawley, D. & Altizer, S.** (2011) Disease ecology meets ecological immunology: understanding the links between organismal immunity and infection dynamics in natural populations. *Functional Ecology*, **25**, 48-60. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01753.x.

**Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guégan, J., Meunier, C., Bargues, M., Mas-Coma, S. & Renaud, F.** (2004) Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Molecular Ecology*, **4**, 689-690. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00786.x.

- Hurtrez-Boussès, S., Meunier, C., Durand, C. & Renaud, F.** (2001) Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection*, **3**, 841-849.
- Jarne, P. & Théron, A.** (2001) Genetic structure in natural populations of flukes and snails : a practical approach and review. *Parasitology*, **123**, 27-40. doi: 10.1017/S0031182001007715.
- Johachim, H., Little, T. & Ebert, D.** (2001) Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, **55**, 1136-1145.
- Khan, M., Sajid, M., Riaz, H., Ahmed, N., He, L., Shahzad, M., Hussain, A., Khan, M., Iqbal, Z. & Zhao, J.** (2013) The global burden of fasciolosis in domestic animals with an outlook on the contribution of new approaches for diagnosis and control. *Parasitology Research*, **112**, 2421-2430. doi: 10.1007/s00436-013-3464-6.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A. & Bargues, M.D.** (2009) *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Advances in Parasitology*, **69**, 41-146. doi: 10.1016/S0065-308X(09)69002-3.
- Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Bargues, M., Mas-Coma, S., Pointier, J., Jourdane, J. & Renaud, F.** (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular Ecology*, **10**, 1333-1340.
- Mitat, A.** (2009) Búfalos de Agua en Cuba: Orígen y evolución. *Asociación Cubana de Producción Animal*, **3**, 45-48.
- Rice, H.** (1984) Analysing tables of statistical Tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Rojas, L., Vázquez, A., Domenech, I. & Robertson, L.** (2010) Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends in Parasitology*, **26**, 26-34. doi: 10.1016/j.pt.2009.10.005.
- Schulte, R., Makus, C. & Schulemburg, H.** (2013) Host-parasite coevolution favours parasite genetic diversity and horizontal gene transfer. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**, 1836-1840. doi: 10.1111/jeb.12174.

**Thompson, J.** (1994) *The Coevolutionary Process*. Chicago, The University of Chicago Press.

**Tolan, R.** (2011) Fascioliasis Due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Infection: An Update on This 'Neglected' Neglected Tropical Disease. *LabMedicine*, **42**, 107-116. doi: 10.1309/LMLFBB8PW4SA0YJI.

**Uffo, O., Acosta, A., Martínez, S. & Ronda, R.** (2012) Genetic characterization of Cuban Creole cattle using molecular tools. *Biología Aplicada*, **29**, 127-128.

**Valero, M., Perez-Crespo, I., Khoubbane, M., Artigas, P., Panova, M., Ortiz, P., Maco, V., Espinoza, J. & Mas-Coma, S.** (2012) *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic areas: Valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**, 403-410. doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.009.

**Vázquez, A., Sánchez, J. & Hevia, Y.** (2009) Distribución y preferencia de hábitats de moluscos hospederos intermedios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **61**, 248-253.

**Vázquez, A., Sánchez, J., Pointier, J., Théron, A. & Hurtrez-Boussès, S.** (2014) *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *Journal of Helminthology*, **88**, 434-440. doi: 10.1017/S0022149X13000382.

**Vilas, R., Vázquez-Prieto, S. & Paniagua, E.** (2012) Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: Implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**, 45-52. doi: 10.1016/j.meegid.2011.10.010.

**WHO** (2007) The "neglected" neglected worms. *Actions Against Worms Newsletter*; December, 1-8.

**WHO** (2013) Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. *WHO Technical Report Series*, 152p.

**Table 1. Prevalence (%) of *Fasciola hepatica* isolates in cows and buffaloes\* from localities in Cuba; N = number of hosts examined.**

<i>F. hepatica</i> population	Geographic Coordinates	Province	N	%
Artemisa	22°43'25.0"N ; 82°49'56.6"W	Artemisa	30	33.33
Bahía Honda	22°53'26.9"N ; 83°18'11.5"W	Pinar del Río	15	93.33
Guane	22°11'16.1"N ; 84°0'34.9"W	Pinar del Río	5	20
La Palma	22°44'56.4"N ; 83°30'25.2"W	Pinar del Río	10	100
La Palma		Pinar del Río	20	75
Loma Candelaria	22°34'31.2"N ; 83°23'9.6"W	Pinar del Río	17	100
Santa Cruz	23°5'21.5"N ; 81°50'32.3"W	Mayabeque	40	77.55
Sagua	22°52'16.3"N ; 80°11'12.1"W	Villa Clara	18	61.11
Jaruco*	23°4'44.2"N ; 81°55'3.5"W	Mayabeque	30	86.66

**Table 2. Mean number ( $\pm$ SD) of alleles together with observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_s$ ) heterozygosities, and  $F_{IS}$  values (level of significance after Bonferroni correction) for each *Fasciola hepatica* population; values in italics are those obtained without locus FH23.**

<i>F. hepatica</i> population	Analysed flukes	Alleles	$H_o$	$H_s$	$F_{IS}$
<b>Artemisa</b>	28	3.75 ( $\pm$ 1.26)	0.415 ( $\pm$ 0.309)	0.450 ( $\pm$ 0.233)	0.078 (NS)
		3.67 ( $\pm$ 1.53)	0.463 ( $\pm$ 0.36)	0.421 ( $\pm$ 0.277)	-0.098 (NS)
<b>Bahía Honda</b>	30	4.75 ( $\pm$ 2.36)	0.383 ( $\pm$ 0.345)	0.583 ( $\pm$ 0.248)	0.343 (0.0030)
		5.33 ( $\pm$ 2.52)	0.510 ( $\pm$ 0.285)	0.551 ( $\pm$ 0.294)	0.074 (NS)
<b>La Palma</b>	29	4.5 ( $\pm$ 1.92)	0.473 ( $\pm$ 0.297)	0.537 ( $\pm$ 0.225)	0.119 (NS)
		5 ( $\pm$ 2)	0.511 ( $\pm$ 0.352)	0.529 ( $\pm$ 0.275)	0.032 (NS)
<b>Jaruco</b>	23	4.25 ( $\pm$ 2.22)	0.372 ( $\pm$ 0.334)	0.523 ( $\pm$ 0.24)	0.290 (NS)
		5 ( $\pm$ 2)	0.496 ( $\pm$ 0.275)	0.475 ( $\pm$ 0.27)	-0.042 (NS)
<b>Loma</b>	29	4.75 ( $\pm$ 1.71)	0.422 ( $\pm$ 0.254)	0.571 ( $\pm$ 0.243)	0.261 (0.005)
<b>Candelaria</b>		5 ( $\pm$ 2)	0.502 ( $\pm$ 0.242)	0.539 ( $\pm$ 0.288)	0.07 (NS)
<b>Guane</b>	19	5 ( $\pm$ 1.83)	0.496 ( $\pm$ 0.203)	0.605 ( $\pm$ 0.291)	0.181 (NS)
		4.67 ( $\pm$ 2.08)	0.453 ( $\pm$ 0.225)	0.521 ( $\pm$ 0.291)	0.131 (NS)
<b>Santa Cruz</b>	30	5.25 ( $\pm$ 2.22)	0.429 ( $\pm$ 0.38)	0.59 ( $\pm$ 0.252)	0.274 (0.0009)
		5.67 ( $\pm$ 2.52)	0.572 ( $\pm$ 0.308)	0.55 ( $\pm$ 0.293)	-0.039 (NS)
<b>Sagua</b>	12	4 ( $\pm$ 0.82)	0.513 ( $\pm$ 0.164)	0.625 ( $\pm$ 0.122)	0.178 (NS)
		4 ( $\pm$ 1)	0.573 ( $\pm$ 0.136)	0.577 ( $\pm$ 0.095)	0.007 (NS)

**Table 3.** Estimates of pairwise genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) values between populations; AT: Artemisa, BH: Bahía Honda, LP: La Palma, JA: Jaruco, LC: Loma Candelaria, GU: Guane, SC: Santa Cruz. SA: Sagua; \* level of significance  $p < 0.05$

	AT	BH	LP	JA	LC	GU	SC	SA
AT	0							
BH	0.03	0						
LP	0.12	0	0					
JA	0.02	0	0	0				
LC	0.14	0.01	0.04	0.06	0			
GU	<b>0.14*</b>	0.02	0.06	0.06	0	0		
SC	0.12	0.02	0.08	0.05	0	0	0	
SA	0.13	0.02	0.05	0.05	0	0	0.05	0

**Table 4. Occurrence of multilocus genotypes (MLGT) and genotypic diversity in *Fasciola hepatica* populations; N – number of analysed flukes after excluding individuals with at least one locus non-amplified, with one MLGT repeat in each of BG, BH (Artemisa) and AC, AT (Santa Cruz) with  $p_{\text{sex}} < 0.05$ .**

<i>F. hepatica</i> population	N	Genotypic Diversity	No. of MLGT repeats
<b>Artemisa</b>	23	0.861	<i>AC, AJ</i> (8), <i>BF, BG</i> (3), <i>BH</i> (3), <i>BO, BP, D, H, I, N, U</i>
<b>Bahía</b>	19	0.994	<i>AC, AJ, AM, AX, AZ, B, BC, BE, BJ, BM, BR, CA, CB, CC, F, V</i> (2), <i>W, Y</i>
<b>Honda</b>			
<b>La Palma</b>	9	0.972	<i>AF</i> (2), <i>AR, AS, AW, BQ, BX, G, V, A, AD, AF, AG, AH, AI, AJ</i> (2), <i>AK, AU</i> (2), <i>AW</i> (3), <i>AX, BK, BV, BW, J, V, W, Z</i>
<b>Jaruco</b>	26	0.978	
<b>Loma</b>			<i>AA, AE, AF, AJ</i> (2), <i>AO, AW, B, BA, BD, BG, BH, BN, BZ, CE, D, K, P, T, U, V</i> (2), <i>W</i>
<b>Candelaria</b>	23	0.992	
<b>Guane</b>	15	1.000	<i>A, AC, AG, AH, AJ, AN, AQ, AV, AW, AX, BU, CF, R, S, T</i>
<b>Santa Cruz</b>	24	0.956	<i>AC</i> (4), <i>AJ</i> (2), <i>AL, AP</i> (2), <i>AT, AU</i> (3), <i>AX, AY, BB, BI, BL, L, M, O, P</i> (2), <i>Q</i>
<b>Sagua</b>	11	1.000	<i>A, AB, AP, BS, BW, BY, C, CD, E, R, X</i>



Submitted to Veterinary Parasitology

## **Unveiling snail hosts of fasciolosis: a multiplex PCR for the simultaneous identification of three cryptic *Galba* species and its application in communities from North and South America**

Pilar Alda <sup>1,2,\*</sup>, Manon Lounnas <sup>2,\*</sup>, Antonio Alejandro Vázquez Perera <sup>3</sup>, Alfredo Gutiérrez <sup>3</sup>, Nelson Uribe <sup>4</sup>, Alberto Orlando-Nárvaez <sup>5</sup>, Jenny Muzzio-Aroca <sup>6</sup>, Luiggi Martini Robles <sup>7</sup>, Maritza Celi-Erazo <sup>8</sup>, Orlando Ayaqui <sup>9</sup>, José Arenas <sup>10</sup>, Flavia Caroll Muñiz Pareja <sup>11</sup>, Eric Sam Loker <sup>12</sup>, Oscar Noya <sup>13</sup>, Lucila Prepelitchi <sup>14</sup>, Cristina Wisnivesky-Colli <sup>14</sup>, Patrice David <sup>15</sup>, Jean-Pierre Pointier <sup>16</sup>, Sylvie Hurtrez-Boussès <sup>2,17</sup>

<sup>1</sup> Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CONICET-UNLP), Boulevard 120 s/n e/61 y 62, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Institut de Recherche pour le Développement, MIVEGEC, UM1 – CNRS 5290 – IRD 224 Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Centre IRD, Montpellier, France.

<sup>3</sup> Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>4</sup> Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>5</sup> Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI.

<sup>6</sup> Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI, Guayaquil, Ecuador.

<sup>7</sup> Laboratorio de Parasitología Luiggi Martini y colaboradores, Guayaquil, Ecuador.

<sup>8</sup> CIZ, Universidad Central de Ecuador, Quito, Ecuador.

<sup>9</sup> Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru

<sup>10</sup> Facultad de Biología Marina, Universidad Científica del Sur, Peru.

<sup>11</sup> Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco, Peru.

<sup>12</sup> Center for Evolutionary and Theoretical Immunology, Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM87131, USA.

<sup>13</sup> Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela y Centro para Estudios sobre Malaria IAES-INH, MPPS, Caracas, Venezuela.

<sup>14</sup> Unidad de Ecología de Reservorios y Vectores de Parasitos, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 4 piso, Laboratorio 55, Ciudad Autónoma de Buenos Aires C1428EGA, Argentina.

<sup>15</sup> Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive UMR 5175, 1919 Route de Mende, Campus CNRS, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>16</sup> USR 3278 CNRS–EPHE, CRIOBÉ Université de Perpignan, Perpignan, France.

<sup>17</sup> Département de Biologie–Ecologie, Faculté des Sciences, Université Montpellier 2, Montpellier, France.

P. Alda and M. Lounnas contributed equally to the work

\* To whom correspondence should be addressed: [pilaralda@gmail.com](mailto:pilaralda@gmail.com) (P. Alda)

Total word count: 2,324 (excluding references, tables, and figures)

Page count: 16 in total

10 text pages (without references)

2 tables

1 figure

2 tables in Supplementary material

Running head: Identifying cryptic *Galba* species

**Key words:** *Galba truncatula*, *Galba cubensis*, *Galba neotropica*, *Galba schirazensis*, snails, *Fasciola hepatica*, South America, North America.

## Abstract

We designed a multiplex PCR—based in length polymorphism of microsatellites—that enables the identification of three cryptic *Galba* species: *Galba cubensis*, *Galba schirazensis*, and *Galba truncatula*. These species are snail (or potential snail hosts) of fasciolosis. We then applied the multiplex PCR to 952 individuals from 96 localities ( $n = 9.5 \pm 2.7$  per locality) from North and South America. We found that 89 localities presented *G. cubensis*, *G. schirazensis*, and/or *G. truncatula*. We found ten localities with two species and two localities with the three species coexisting. The other 77 localities were composed by one of these species. Other *Galba* species—not amplified by the multiplex PCR—have been found at eight localities. These other species were *Galba humilis*, *Galba viator*, and *Galba cousins*. Here, we report for the first time the presence of *G. schirazensis* in USA and the northernmost distribution for this species. This is also the first molecular identification of *G. truncatula* in USA. In order to validate the accuracy of the multiplex PCR, we amplified and sequenced the internal transcribed spacer 2 and the cytochrome C oxydase subunit 1 in 147 individuals. The sequences were consistent with the results found by the multiplex PCR. This technique is accurate, cheap, simple, rapid, reproducible, and adaptable to a large set of individuals. This technique can be considered as a helpful tool to be used in further studies that focus on studying ecological preferences of *Galba* species and intraspecific interactions in order to better comprehend the epidemiology of fasciolosis.

## Introduction

*Galba* snails (Lymnaeidae) are intermediate hosts of fasciolosis, a disease that infect humans and domestic livestock (Mas-Coma et al. 2001). Despite the epidemiological relevance of these snails, their past dispersal and current distribution are unknown because the morphology of most common characters used to differentiate lymnaeids (*i.e.*, reproductive organs and shell) prevent from an accurate differentiation between them (Correa et al. 2011). In particular, *Galba cubensis*, *Galba schirazensis*, *Galba truncatula*, *Galba neotropica*, *Galba humilis*, and *Galba viator* have a similar reproductive system and a shell that varies with environmental conditions (Correa et al. 2010, 2011). Thus, many populations probably have been misidentified (Correa et al. 2010). For instance, *G. schirazensis* has often been confused with *G. truncatula* in Europe and Asia and with *G. truncatula* or *G. cubensis* in America (Correa et al. 2010, Bargues et al. 2011). Nonetheless, mitochondrial and nuclear markers are useful to solve the systematic problems among the *Galba* species (Correa et al. 2010, 2011, Bargues et al. 2011). However, neither the molecular markers nor the microsatellites allow to differentiate the recently described species *G. neotropica* from *G. cubensis* suggesting that both taxa would be considered as conspecifics (Correa et al. 2011, Lounnas et al., *in preparation*).

*Galba* species are well-known snail hosts of fasciolosis (Jabbour-Zahab et al. 1997, Bargues et al. 2007) but unequally susceptible to the parasite—*i. e.*, native American *Galba* species (as *G. cubensis*) are better hosts for the local parasite than invasive *Galba* species (as *G. truncatula*, Sanabria et al. 2012). The role of *G. schirazensis* as an intermediate host remains unknown (Bargues et al. 2011, Caron et al. 2014, Dreyfuss et al. 2015).

If the morphologic approach prevent us from accurately differentiate those *Galba* species that are unequally susceptible to become snail hosts of fasciolosis, a molecular identification tool would help to study the current distribution of morphologically cryptic *Galba* species and to better understand the epidemiology of fasciolosis. We need a method able to identify snail individuals quickly and for large samples. Thus, the main goal of this work was to develop a molecular tool that enables us to specifically identify *G. cubensis*, *G. schirazensis*, and *G. truncatula*, the three *Galba* species which specific primers amplifying microsatellites have been already described (Trouvé et al. 2000, Lounnas et al., *in preparation*). We designed a multiplex PCR—multiple primers within a single PCR mixture—that uses specific primers to amplify microsatellites (DNA sequences in which certain base pairs are repeated). We simultaneously differentiated the three target species by virtue of the varying size of specific microsatellites.

Comparing the results with the species identification by mitochondrial and nuclear markers tested the accuracy of this method. We applied the multiplex PCR to identify a total of snails from 96 localities from North and South America

## Material and methods

### Samples

We collected individuals of *Galba* species from 96 localities from Argentina, Canada, Colombia, Ecuador, Peru, Venezuela, and USA (Table S1 and S2) between October 1998 and May 2015. Three of these localities have been resampled because we observed high prevalence of fasciolosis in livestock and we surveyed the infected *Galba* individuals (unpublished data): La Alborada in Colombia and La Trampa and Hotel Valle Grande in Venezuela (Table S1). Immediately after collection, individuals were stored in 70% ethanol until DNA analyses.

### DNA extraction

DNA from all the individuals was extracted using Chelex protocol following Estoup and Martin (1996) adapted to 96-well plates. Only the DNA of one individual of *G. viator* was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to manufacturers' instructions.

### Multiplex PCR optimization

Specific primers that amplify microsatellites have been already described for *Galba truncatula* (Trouvé et al. 2000), *Galba cubensis* (Lounnas et al., *in preparation*), and *Galba schirazensis* (Lounnas et al., *in preparation*). We designed a primer mix with different combinations of primers that amplify microsatellites of different sizes for each of the species and that enable us to identify the three species (data not shown). We also tested different concentrations of each primer and different PCR programs (data not shown).

The mix that contains the combination of primers and the primer's concentration that allowed for an accurate identification of the three species is shown in Table 2. We amplified the sequences in a total volume of 10 µl containing 5 µl of Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen), 1 µl of the primer mix, and 1 µl of DNA in an Eppendorf Thermal Cycler. The PCR program that showed clear and defined bands in the agarose gel had an initial denaturation step at 95 °C for 15 minutes; followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 52 °C for 90 seconds, and extension

at 72 °C for one minute; followed by a final extension at 60 °C for 30 minutes. The amplification products were electrophoretically resolved after 2 hours at 100V in a 5% agarose gel and stained with EZ-Vision. We prepared the 5% agarose gel by heating it in a microwave at the lower power setting and mixing it every 30 seconds.

#### *Multiplex PCR test, application, and validation*

In order to test the multiplex PCR specificity, we used individuals of *G. cubensis*, *G. schirazensis*, *G. truncatula*, *G. humilis*, *G. viator*, and *G. cousinsi* genetically identified by Correa et al. (2010, 2011; Table 1). The first five species are extremely close in terms of morphology but *G. cousinsi* is easily distinguishable using only the morphology shell and reproductive organs (Paraense 1995). Nevertheless, we include *G. cousinsi* in the test because the six species are in the same phylogenetic clade—the *Galba* clade (Correa et al. 2011).

We then applied the multiplex PCR to 952 individuals from the 96 localities ( $N = 9.5 \pm 2.7$  per locality) sampled in this study. In order to validate the multiplex PCR, we amplified the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) and the cytochrome C oxydase subunit 1 (CO1) in 102 individuals identified by the multiplex PCR and also in 12 individuals where the multiplex PCR did not amplify the DNA. We used primers provided by Almeyda-Artigas et al. (2000) to amplify ITS-2: NEWS2 (forward) 5' TGTGTCGATGAAGAACGCAG 3' and ITS2-RIXO (reverse) 5' TTCTATGCTAAATTCAAGGGG 3'; and primers provided by Folmer et al. (1994) to amplify CO1: LCO1490 (forward) 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' and HCO2198 (reverse) 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'). PCR amplification for each pair of primers was performed in a total volume of 25 µl containing 12.5 µl of Taq PCR Master Mix (Qiagen), 2.5 µl of each primer, and 2 µl of DNA in an Eppendorf Thermal Cycler with an initial denaturation step at 95 °C for 15 minutes; followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 50 °C for one minute, extension at 72 °C for one minute; and a final elongation at 60 °C for 30 minutes. The amplification products were electrophoretically checked in a 1% agarose gel and stained with EZ-Vision. DNA sequencing was performed by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) using PCR-amplified products as templates. We compared the sequences obtained with the ones available in GenBank using BLAST.

## **Results**

The multiplex PCR successfully differentiates the individuals of *G. cubensis*, *G. schirazensis*, and *G. truncatula* genetically identified by Correa et al. (2011; Table 1,

Fig. 1). Any amplification was observed with the DNA of *G. humilis*, *G. cousini*, and *G. viator* genetically identified by Correa et al. (2011; Table 1).

Using routinely the multiplex PCR, we differentiated 286 individuals of *G. cubensis*, 294 of *G. schirazensis*, and 327 of *G. truncatula* from North and South America (Table S1).

The multiplex PCR did not amplify the DNA of 45 individuals presented at eight localities (Table S2). The amplification of ITS-2 and/or CO1 showed that these individuals belong to *G. viator* ( $n = 1$ ), *G. cousini* ( $n = 1$ ), and *G. humilis* ( $n = 43$ ) (Table S2). These results validated the accuracy of the multiplex PCR in the sense that it doesn't give signal for these species.

From the 96 localities sampled, 89 harbored *G. cubensis*, *G. schirazensis*, and/or *G. truncatula*: 77 harbored only one of three species (28 harbored *G. cubensis*, 21 harbored *G. schirazensis*, and 28 harbored *G. truncatula*), two harbored *G. cubensis* and *G. schirazensis* together, four *G. cubensis* and *G. truncatula*, four *G. schirazensis* and *G. truncatula*, and two harbored the three species together (Table S1). In the three localities that have been resampled, we found the compositions in both dates: *G. schirazensis* in La Alborada (Colombia) and La Trampa (Venezuela) and *G. schirazensis* and *G. truncatula* in Hotel Valle Grande (Venezuela) (Table S1). In Huagrahuma (Ecuador), we found *G. schirazensis* and other *Galba* species not amplified by the multiplex PCR and later identified by CO1 and ITS-2 as *G. cousini*. The amplification of CO1 and/or ITS-2 of 73 individuals—already identified by the multiplex PCR as *G. cubensis* ( $n = 14$ ), *G. schirazensis* ( $n = 29$ ), and *G. truncatula* ( $n = 30$ )—validated the accuracy of the multiplex PCR (Table S1). The amplification of CO1 and/or ITS-2 of 29 individuals already identified by the multiplex PCR as *G. cubensis* yielded PCR products which sequences had 92-100% identity with *G. neotropica* (probably a conspecific species of *G. cubensis*; Correa et al. 2011, Lounnas et al., *in preparation*), *G. viator*, or *Fossaria bulimoides* (Table S1). These results showed the uncertainty that it exists within this group. Moreover, the amplification of CO1 and/or ITS-2 of individuals from Venezuela and USA already identified by the multiplex PCR as *G. cubensis* yielded PCR products that sequences matched with *G. neotropica* or *F. bulimoides* when analyzing CO1 and with *G. cubensis* or *G. viator* when analyzing ITS-2 (Table S1). The amplification of ITS-2 and/or CO1 showed that the individuals not amplified by the multiplex PCR belong to *G. viator* ( $n = 1$ ), *G. cousini* ( $n = 1$ ), and *G. humilis* ( $n = 43$ ) (Table S2). These results also validated the accuracy of the multiplex PCR.

## Discussion

We developed a molecular tool to identify three cryptic snail hosts (or potential snail host) of fasciolosis: *Galba cubensis*, *Galba schirazensis*, and *Galba truncatula*. We designed a multiplex PCR that uses specific primers that amplify microsatellites with varying size of these species (Table 2, Fig. 1) and that do not amplify DNA of other cryptic *Galba* species like *Galba viator* and *Galba humilis*, and other related species as *Galba cousinsi*. The amplification of CO1 and/or ITS-2 of 118 individuals from North and South America validated the accuracy of the multiplex PCR.

Until now, the only way to correctly identify *G. truncatula*, *G. cubensis*, and *G. schirazensis* was by amplifying and sequencing a mitochondrial or nuclear genetic marker. This technique takes time since most researchers have to send the PCR product elsewhere to get the sequence. Instead, the multiplex PCR allowed for rapid and simultaneous identification of a large set of individuals of *Galba* species with less expensive resources and/or complex equipment. Multiplex PCRs have been already used to identify different vector species that are morphologically similar, like cryptic *Anopheles* species (Kengne et al. 2001), or different parasite species that are diluted within feces or blood (Bohórquez et al. 2015, Sumbria et al. 2015).

We applied the multiplex PCR here designed to identify 952 *Galba* individuals from the 96 localities from North and South America. We found *G. cubensis* in Argentina, Ecuador, Peru, USA, and Venezuela; *G. schirazensis* in Colombia, Ecuador, Peru, USA, and Venezuela; and *G. truncatula* in Argentina, Peru, USA, and Venezuela. This is the first report of *G. schirazensis* in USA and also the northernmost record for this species. Moreover, this is the first molecular identification of *G. truncatula* in USA and until now this species was only reported in this country using morphological characters that are not reliable for a clear identification (Burch 1982).

This study demonstrated that the three species of *Galba* can coexist at the same locality living in sympatry or close to one another. To our knowledge, the coexistence of *Galba* species has been already reported between *G. viator* and *G. neotropica* (Standley et al. 2013) and between *G. truncatula* and *G. schirazensis* (Bargues et al. 2011). These authors pointed out that in Spain sometimes specimens of *G. schirazensis* and *G. truncatula* were so mixed that one was convinced to deal with only one species. The multiplex PCR developed herein would permit to easily distinguish between mono and multispecific communities of *Galba*.

We found the same species at the localities that have been resampled later in time, suggesting that a competitive displacement between these species at those localities has not occurred. This result, however, is not conclusive about replacements among

*Galba* species that could suggest competition because we only resampled few localities, individuals, and dates. Introduced species like *G. truncatula* in America (Meunier et al. 2001) could have an impact upon native species like *G. cubensis* (Grosholz 2002, Rodriguez 2006). Moreover, designing the microsatellite markers for *G. viator* and *G. humilis* would permit to include some of those specific primers in the multiplex PCR in order to also identify these cryptic species.

The mismatch of 29 individuals that were identified by the multiplex PCR as *G. cubensis* and whose sequences blasted in GenBank with sequences from *G. neotropica*, *G. viator*, and *Fossaria bulimoides* reflects the uncertainty within this group. Since GenBank relies on direct submissions from individual laboratories, misidentifications of species are common—especially within cryptic species as the *Galba* group (Shen et al. 2013). Some authors suggested that *G. neotropica* and *G. cubensis* could be considered conspecifics (Correa et al. 2011, Lounnas et al., *in preparation*). Genetic diversity studies throughout America will help us to disentangle the identity of *G. cubensis* and *G. neotropica*.

In conclusion, we have developed a multiplex PCR that identifies cryptic snail hosts of fasciolosis—*G. cubensis*, *G. truncatula*, and *G. schirazensis*—which is: (i) accurate, because it was validated by the results obtained by mitochondrial or nuclear markers; (ii) cheap, compared to amplifying and sequencing molecular markers; (iii) simple, because only one PCR is needed to perform the amplification of specific loci; (iv) rapid, because the results are available in less than one day; and (v) reproducible and adaptable to a large set of individuals. Further studies should combine this technique for species identification with data on environmental variables to understand the ecological preferences for habitat of each *Galba* species and the spreading of fasciolosis in America.

## Acknowledgments

We would like to express our gratitude to Nicolás Bonel for their useful comments to earlier drafts of the manuscript. Fellowships granted by Erasmus Mundus PRECIOSA and Méditerranée Infection supported research stays of PA at the Institut de Recherche pour le Développement, MIVEGEC (Montpellier, France). AV was supported by a grant from IRD (BEST) and ML by a doctoral fellowship from University of Montpellier. This study was financially supported by IRD and CNRS.

## References

- Almeyda-Artigas, R. J., M. D. Bargues, and S. Mas-Coma. 2000. ITS-2 rDNA sequencing of Gnathostoma species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *The Journal of parasitology* 86:537–544.
- Bargues, M. D., P. Artigas, M. Khoubbane, R. Flores, P. Glöer, R. Rojas-García, K. Ashrafi, G. Falkner, and S. Mas-Coma. 2011. *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail distorting fascioliasis data: Genotype, phenotype, ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. *PLoS ONE* 6:e24567.
- Bargues, M. D., P. Artigas, R. L. Mera Y Sierra, J. P. Pointier, and S. Mas-Coma. 2007. Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of tropical medicine and parasitology* 101:621–641.
- Bohórquez, G. A., M. Luzón, R. Martín-Hernández, and A. Meana. 2015. New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tapeworm. *Veterinary Parasitology* 207:56–63.
- Burch, J. B. 1982. North American freshwater snails. *Walkeriana* 1:217–365.
- Caron, Y., K. Martens, L. Lempereur, C. Saegerman, and B. Losson. 2014. New insight in lymnaeid snails (Mollusca, Gastropoda) as intermediate hosts of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Belgium and Luxembourg. *Parasites & vectors* 13:66.
- Correa, A. C., J. S. Escobar, P. Durand, F. Renaud, P. David, P. Jarne, J.-P. Pointier, and S. Hurtrez-Boussès. 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC evolutionary biology* 10:381.
- Correa, A. C., J. S. Escobar, O. Noya, L. E. Velásquez, C. González-Ramírez, S. Hurtrez-Boussès, and J. P. Pointier. 2011. Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. *Infection, Genetics and Evolution* 11:1978–1988.
- Dreyfuss, G., A. C. Correa, F. F. Djuikwo-Teukeng, A. Novobilský, J. Höglund, J. Pankrác, M. Kašný, P. Vignoles, S. Hurtrez-Boussès, J. P. Pointier, and D. Rondelaud. 2015. Differences in the compatibility of infection between the liver flukes *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in a Colombian population of the snail *Galba* sp. *Journal of Helminthology*:720–726.

- Estoup, A., and O. Martin. 1996. Marqueurs microsatellites: isolement à l'aide de sondes non-radioactives, caractérisation et mise au point.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology 3:294–299.
- Grosholz, E. 2002. Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. Trends in Ecology & Evolution 17:22–27.
- Jabbour-Zahab, R., J. P. Pointier, J. Jourdane, P. Jarne, J. a. Oviedo, M. D. Bargues, S. Mas-Coma, R. Anglés, G. Perera, C. Balzan, K. Khallayoune, and F. Renaud. 1997. Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. Acta Tropica 64:191–203.
- Kengne, P., H. D. Trung, V. Baimai, M. Coosemans, and S. Manguin. 2001. A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of the *Anopheles minimus* group in Southeast Asia. Insect Mol.Biol. 10:427–435.
- Mas-Coma, S., I. R. Funatsu, and M. D. Bargues. 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. Parasitology 123 Suppl:S115–S127.
- Meunier, C., C. Tirard, S. Hurtrez-Boussès, P. Durand, M. Bargues, S. Mas-Coma, J. Pointier, J. Jourdane, and F. Renaud. 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. Molecular Ecology 10:1333–1340.
- Paraense, W. 1995. *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887, from Ecuador (Gastropoda: Lymnaeidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz:605–609.
- Rodriguez, L. F. 2006. Can invasive species facilitate native species? Evidence of how, when, and why these impacts occur. Biological Invasions 8:927–939.
- Sanabria, R., R. Mouzet, B. Courtioux, P. Vignoles, D. Rondelaud, G. Dreyfuss, J. Cabaret, and J. Romero. 2012. Intermediate snail hosts of French *Fasciola hepatica*: *Lymnaea neotropica* and *Lymnaea viatrix* are better hosts than local *Galba truncatula*. Parasitology Research 111:2011–2016.
- Shen, Y.-Y., X. Chen, and R. W. Murphy. 2013. Assessing DNA Barcoding as a Tool for Species Identification and Data Quality Control. PLoS ONE 8:e57125.

- Standley, C. J., L. Prepelitchi, S. M. Pietrokovsky, L. Issia, J. R. Stothard, and C. Wisnivesky-Colli. 2013. Molecular characterization of cryptic and sympatric lymnaeid species from the *Galba/Fossaria* group in Mendoza Province, Northern Patagonia, Argentina. *Parasites & vectors* 6:304.
- Sumbria, D., L. D. Singla, A. Sharma, M. S. Bal, and S. Kumar. 2015. Multiplex PCR for detection of *Trypanosoma evansi* and *Theileria equi* in equids of Punjab, India. *Veterinary Parasitology* 211:293–299.
- Trouvé, S., L. Degen, C. Meunier, C. Tirard, S. Hurtrez-Boussès, P. Durand, J. F. Guégan, J. Goudet, and F. Renaud. 2000. Microsatellites in the hermaphroditic snail, *Lymnaea truncatula*, intermediate host of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Molecular Ecology* 9:1662–1664.

## Tables

**Table 1.** Individuals of *Galba* species used to test the multiplex PCR (n = 11). These individuals have been genetically identified by Correa et al. (2011). ND, no data available.

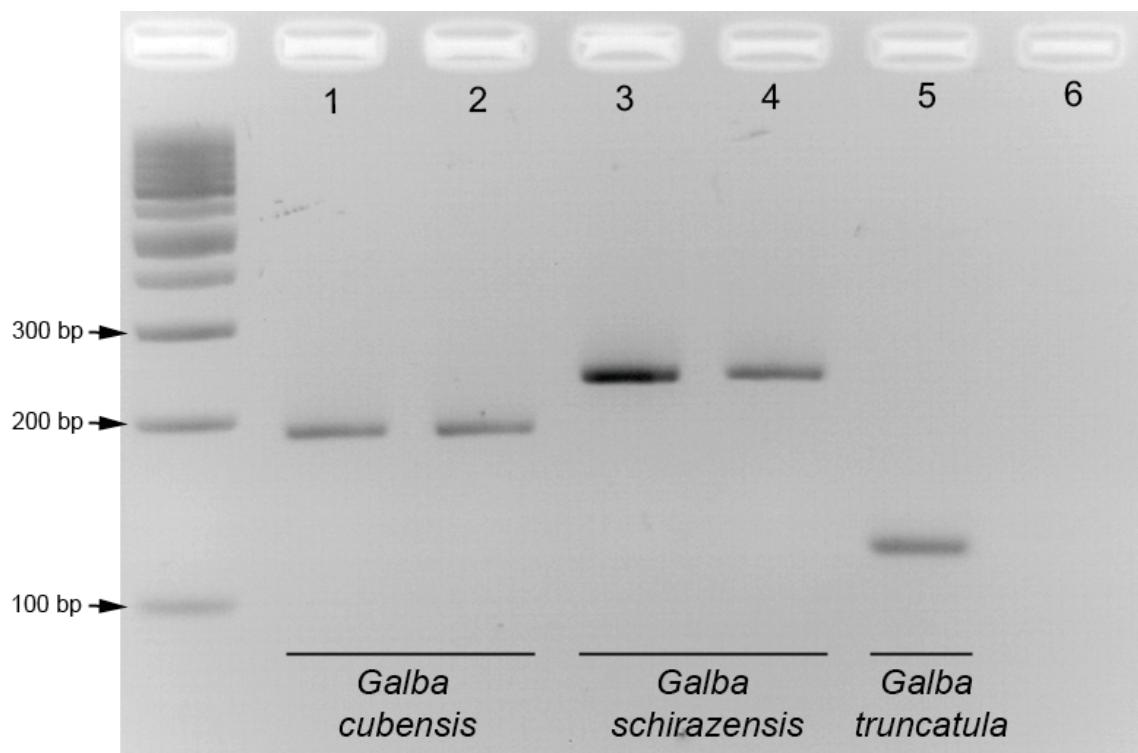
Species	Country, locality	Coordinates
<i>Galba cubensis</i>		
LCUSA1, LCUSA2	USA, Charleston County (South Carolina)	32°45'59"N 79°49'35"W
<i>Galba schirazensis</i>		
VT3	Venezuela, La Trampa	08°33'29"N 71°27'15"W
M10	Colombia, Matasano (Antioquia)	06°25'58"S 75°22'28"W
<i>Galba truncatula</i>		
L06	France, Limousin region	45°47'05"N 01°11'36"E
<i>Galba viator</i>		
LVX2, LVX3	Argentina, Río Negro	40°44'07"S 66°37'27"W
<i>Galba cousinsi</i>		
LCM2, LCM3	Venezuela, Mucubají	08°47'54"N 70°49'33"W
<i>Galba humilis</i>		
Lh1, Lh 2	USA	ND

**Table 2.** Primers used for the multiplex PCR-detection of *Galba cubensis*, *Galba schirazensis*, and *Galba truncatula* based in length polymorphism of microsatellites. (f): forward; (r) reverse.

Primer	Repeat motif	Sequence (5' – 3')	GenBank Accession number	PCR product size	Primer's concentration	Reference
Lc34	(AC) <sub>12</sub>	GTCACTACTGCTT GTCTCAGC (f) AAAAGACTTTAAC CCTTACCCACCC (r)	AF226985	190	2	Lounnas et al. ( <i>in prep</i> )
Ls23	(AC) <sub>16</sub>	AARGACCCAGTG GGGAAG (f) TGGGGAAGGTTCT AATTGTTT (r)	KT285822	235	8	Lounnas et al. ( <i>in prep</i> )
Lt37	(TC) <sub>11</sub> (T) <sub>2</sub> (TC) <sub>3</sub>	GTCCAGTCTTGT ATGTC (f) GTTAAGTACCCAA CTTCTTC (r)	KT324723	120	10	Trouvé et al. (2000)

## Figures captions

**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR products of individuals of *Galba* species. These individuals have been genetically identified by Correa et al. (2011). Lanes: 1, LCUSA1; 2: LCUSA2; 3: VT3; 4: M10; 5: L06; 6: negative control.



## First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean

A. Gutiérrez<sup>1</sup>, A.A. Vázquez<sup>1</sup>, Y. Hevia<sup>1</sup>, J. Sánchez<sup>1</sup>, A.C. Correa<sup>2</sup>,  
S. Hurtrez-Boussès<sup>3</sup>, J.-P. Pointier<sup>4</sup> and A. Théron<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Malacología, IPK, Apartado 601, Marianao 13, C. Habana,  
Cuba: <sup>2</sup>GEMI, UMR CNRS-IRD 2724 Centre de recherche IRD, 911,  
Avenue Agropolis BP 6450, 34394 Montpellier, France: <sup>3</sup>Département de  
Biologie-Ecologie, Université de Montpellier, 4 Place E. Bataillon, 34095  
Montpellier Cedex 5, France: <sup>4</sup>USR 3278 CNRS-EPHE, CRIODE, Université  
de Perpignan, 52 Av. Paul Alduy, 66860 Perpignan, France: <sup>5</sup>BETM,  
UMR 5244 CNRS-UPVD, Université de Perpignan, 52 Av. Paul Alduy,  
66860 Perpignan, France

(Accepted 19 June 2010; First Published Online 19 July 2010)

### Abstract

A wild population of the lymnaeid snail *Pseudosuccinea columella* infected by larval stages of *Fasciola hepatica* was discovered in the Pinar del Río Province, Cuba. One of 100 snails was infected in a rice culture field. This is the first time this species has been found acting as intermediate host of *F. hepatica* under natural conditions, not only for Cuba but also for the Caribbean area.

### Introduction

Fasciolosis is a parasitic disease that affects humans and other mammals, especially ruminants, representing a medical and veterinary problem with a serious impact on public health and economy at different levels, from local to national level in several countries (Crossland *et al.*, 1977; Rangel & Martínez, 1994; Roberts & Suhardono, 1996; Claxton *et al.*, 1997; Mas-Coma *et al.*, 1999; Ortiz *et al.*, 2000). The parasite responsible for this disease is the cosmopolitan digenetic trematode *Fasciola hepatica*, with a worldwide distribution, especially in regions where cattle-raising has been developed. The life cycle of *F. hepatica* includes the transmission through a freshwater snail intermediate host belonging to the Lymnaeidae family (see review in Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). In Cuba, only two lymnaeid species occur, *Fossaria cubensis* and *Pseudosuccinea columella*, but until now the former

had been the only species found to be naturally infected in the field by the parasite (Melcon & Perera, 1994; Gutiérrez *et al.*, 2003a, b). Although no report on *P. columella* harbouring parasite larvae under natural conditions had previously been made for the Caribbean area, this snail is also considered an effective host of *F. hepatica* as it acts as a natural intermediate host in countries such as Brazil, Australia and Argentina (Ueta, 1980; Boray *et al.*, 1985; Oliveira *et al.*, 2002; Prepelitchi *et al.*, 2003) and it shows a high susceptibility to miracidial exposures under laboratory conditions (Léon-Dancel, 1970; Boray *et al.*, 1985; Gutiérrez *et al.*, 2002).

In Cuba, both species occur at high densities in a variety of freshwater bodies, but *F. cubensis* shows a broader distribution throughout the island compared to *P. columella*, which is found from Pinar del Río through Camagüey provinces and seems to be absent from the eastern provinces Las Tunas through Guantánamo (Rojas *et al.*, 2010). Also, recent studies showed that, at least in Cuba, *F. cubensis* occupies the most anthropic habitats and *P. columella* is found more frequently in rural sites

\*Fax: +33 468 662 281  
E-mail: theron@univ-perp.fr

(Cañete *et al.*, 2004). Recently, we detected very high densities of *P. columella* in a rice culture area at the El Pilón locality, Pinar del Río province, and searched to see if some of these snails were naturally infected with intramolluscan stages of the parasite, since a number of cows were normally seen grazing in the area and cases of bovine and caprine fasciolosis had been reported in the neighbouring village of San Andrés. In this paper we report the first infection observed in naturally occurring *P. columella* from Cuba.

## Materials and methods

### *Snail sampling and examination*

The locality of El Pilón is situated west of Bahía Honda village in the municipality of the same name ( $22^{\circ}50'45''N$ ;  $83^{\circ}21'32''W$ ). This area belongs to the mountain system Sierra de los Organos in the Pinar del Río province. The sampling site consisted of a field sown with rice, completely flooded over an area of nearly  $300\text{ m}^2$ . The depth of water did not exceed 0.5 m, with a bottom mainly of mud and plant sediments. Suitability for the development of snail populations is granted for most of the year, with food from aquatic vegetation and water. As cattle-raising occurs in many farms in these localities, the life cycle of *F. hepatica* may be ensured.

Snail samples were taken on 17 December 2007 along the shores of the rice field. Snails were hand-collected from the mud or at the water surface using forceps. Because the abundance of their populations was extremely high, only 100 snails were randomly collected and saved in plastic boxes for laboratory studies. The presence of trematode infection was detected first by stimulation of cercarial shedding using a light source, and, second, by visual inspection of living snails for recognition of intramolluscan parasite development using a stereoscope. The search for infection in living snails lasted for a period of 15 days following snail collection. After this period the remaining snails were crushed and soft parts were analysed carefully, searching for parasite larvae. Each snail found harbouring trematode larvae was scored as infected. The hepatopancreas of each infected snail was dissected to remove redial stages of trematodes, which were stocked at 80% ethanol for later molecular analysis.

### *Molecular identification of *F. hepatica* intramolluscan stages*

DNA extractions of parasite larvae were performed using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. In order to identify *F. hepatica* we amplified the rDNA gene, ITS-1 using the following primers, Lim1657 (forward): 5'-CTGCCCTTGTACACACCG; and ITS1-RIXO: 5'-TGG-CTGCGTTCTTCATCG (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000). For the amplification we used 2 µl of DNA template in a 25 µl reaction volume, containing: 5 µl each of polymerase chain reaction (PCR) buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP, 10 pmol of each primer and 1 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Temperature cycling was: 2 min at 94°C, followed by 30 cycles for 30 s at 94°C, 50°C for 30 s, 72°C for 30 s and finally 7 min at 72°C.

The amplified products (5 µl) were verified on 1% agarose gels in Tris-acetate-EDTA buffer. DNA sequencing was performed by CoGenics Genome Express (Meylan, France) using PCR-amplified products as templates.

The obtained sequences were aligned using CLUSTAL-W implemented in BioEdit v.7.0.9 (Hall & BioEdit, 1999). We used BLASTN 2.2.22 (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to detect homologue sequences.

## Results

Three of the 100 snails sampled were found to be infected by redia of trematodes. The complete ITS-1 sequence obtained from trematode larvae found in *P. columella* from Cuba was 600 pb long. After BLASTanalysis, our sequence was compared with some rDNA homologue sequences of *F. hepatica* available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (AB207139, AB207140, AB207141, AB385611, AJ243016). One of the three larval parasites showed no nucleotide difference with these five sequences. This similarity proves that the redia found in one *P. columella* snail from Cuba was *F. hepatica*. As reported previously, ITS-1 remains an appropriate marker for identification of this trematode species (Mera y Sierra *et al.*, 2009).

## Discussion

In spite of being very susceptible to parasite infection, as shown in previous experimental exposures (Gutiérrez *et al.*, 2002), so far no specimen of *P. columella* had been found harbouring intramolluscan larvae of *F. hepatica* in the field in Cuba. El Pilón is the first Cuban locality where the presence of *P. columella* naturally infected by *F. hepatica* has been demonstrated. All snails collected at the El Pilón site, where infection by the parasite was found, had mantles showing the type of pigmentation considered to be a good marker of susceptible populations of *P. columella* to *F. hepatica* infection (see Gutiérrez *et al.*, 2003b).

The Caribbean area is a region where *F. cubensis* seemed to be the unique intermediate host of *F. hepatica*. This situation is probably due to the fact that this snail is known as a local species, probably occurring in this area for a long time. It was apparently already distributed all over Cuba when it was first described by L. Pfeiffer at the beginning of the 19th century (Pointier *et al.*, 2005). On the contrary, *P. columella* originates from North America and is known as an invasive species which presently has a worldwide distribution (Pointier, 2008). In Cuba *P. columella* was reported for the first time by A. Poey in the middle of the 19th century, but at the present time the species only occurs from Pinar del Río to Camagüey provinces (Rojas *et al.*, 2010). In the Caribbean area *P. columella* was reported from Puerto Rico (Van der Schalie, 1948), Dominican Republic (Gómez *et al.*, 1986), Venezuela (Malek & Chrosciechowski, 1964) and Guadeloupe (Pointier, 2008) but was never recorded as an active intermediate host of *F. hepatica* in the field. However, as already pointed out, in several other invaded countries, such as Australia, Brazil and Argentina, *P. columella* has been reported to be naturally infected by *F. hepatica* (Ueta, 1980; Boray *et al.*, 1985; Prepelitchi *et al.*, 2003). Consequently, the discovery of naturally infected

*P. columella* in Cuba shows that this species must be seriously taken into account in the development of future control programmes of this parasitosis.

## References

- Almeyda-Artigas, R.J., Bargues, M.D. & Mas-Coma, S. (2000) ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology* **86**, 537–544.
- Boray, J.C., Fraser, G.C. & Williams, J.M. (1985) The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. *Australian Veterinary Journal* **62**, 4–6.
- Cañete, R.Y., Sánchez, J.M., Wong, L. & Gutiérrez, A. (2004) Population dynamics of intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* and some environmental factors in San Juan y Martínez municipality, Cuba. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **3**, 257–262.
- Claxton, J., Zambrano, H., Ortiz, P., Amoros, C., Delgado, E., Escurra, E. & Clarkson, M. (1997) The epidemiology of fascioliasis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Parasitology International* **46**, 281–288.
- Crossland, N., Johnstone, A., Beaumont, G. & Bennett, M. (1977) The effect of chronic fascioliasis on the productivity of lowland sheep. *British Veterinary Journal* **133**, 518–524.
- Gómez, J., Vargas, M. & Malek, E.A. (1986) *Pseudosuccinea columella* (Lymnaeidae) in the Dominican Republic and transmission of fascioliasis in the Caribbean region. *The Nautilus* **100**, 66–68.
- Gutiérrez, A., Yong, M., Perera, G., Sánchez, J. & Théron, A. (2002) *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea): its effect on the life history traits of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an uncommon interaction. *Parasitology Research* **88**, 535–539.
- Gutiérrez, A., Pointier, J.-P., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Pérez, R.T., Yong, M., Sánchez, J., Loker, E.S. & Théron, A. (2003a) *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Experimental Parasitology* **105**, 211–218.
- Gutiérrez, A., Pointier, J.-P., Yong, M., Sánchez, J. & Théron, A. (2003b) Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* **90**, 129–134.
- Gutiérrez, A., Hernandez, D. & Sánchez, J. (2005a) Variation of snail's abundance in two water bodies harboring strains of *Pseudosuccinea columella* resistant and susceptible to *Fasciola hepatica* miracidial infection in Pinar del Río province, Cuba. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **7**, 725–727.
- Gutiérrez, A., Yong, M., Sánchez, J., Wong, M. & Pointier, J.-P. (2005b) Competition between *Fossaria cubensis* and two isolates (susceptible and resistant to *Fasciola hepatica*) of *Pseudosuccinea columella* under laboratory conditions. *Haliotis* **35**, 1–11.
- Hall, T.A. & BioEdit (1999) A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium* **41**, 95–98.
- Hurtrez-Boussès, S., Meunier, C., Durand, P. & Renaud, F. (2001) Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection* **3**, 841–849.
- Léon-Dancel, D. (1970) Life history of *Lymnaea columella* (Say) and its experimental infection with *Fasciola hepatica* (L.). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* **2**, 297–305.
- Malek, E.A. & Chrosciechowski, P. (1964) *Lymnaea (Pseudosuccinea) columella* from Venezuela, and notes on the distribution of *Pseudosuccinea*. *The Nautilus* **78**, 54–56.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D. & Esteban, J.G. (1999) Human fascioliasis. pp. 411–434 in Dalton, J.P. (Ed.) *Fascioliasis*. Wallingford, UK, CAB International.
- Melcon, R. & Perera, G. (1994) Estudios ecológicos de *Fossaria cubensis* en sitios de transmisión de *Fasciola hepatica* en las Tunas y La Habana. *Parasitología al Día* **18**, 126–132.
- Mera y Sierra, R., Artigas, P., Cuervo, P., Deis, E., Sidoti, L., Mas-Coma, S. & Bargues, M.D. (2009) Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropicica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Veterinary Parasitology* **166**, 73–79.
- Oliveira, S., Fujii, T., Filha, E. & Martins, A. (2002) Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Aquivos do Instituto de Biologia, São Paulo* **1**, 29–37.
- Ortiz, P., Cabrera, M., Jav, J., Claxton, J. & Williams, D. (2000) Human fascioliasis: prevalence and treatment in a rural area of Peru. *Infectious Disease Review* **1**, 42–46.
- Pointier, J.-P. (2008) *Guide to the freshwater mollusks of the Lesser Antilles*. 128 pp. Hackenheim, Conchbooks.
- Pointier, J.P., Yong, M. & Gutiérrez, A. (2005) *Guide to the freshwater mollusks of Cuba*. 120 pp. Hackenheim, Conchbooks.
- Prepelitchi, L., Kleiman, F., Pietrokovsky, S.M., Moriena, R.A., Racioppi, O., Alvarez, J. & Wisnivesky-Colli, C. (2003) First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **7**, 889–891.
- Rangel, J. & Martínez, E. (1994) Perdidas económicas por decomisos de hígados y distribución geográfica de la fascioliasis bovina en el Estado Tabasco. *Veterinaria de México* **25**, 337–341.
- Roberts, J. & Suhardono (1996) Approaches to the control of fascioliasis in ruminants. *International Journal for Parasitology* **26**, 971–981.
- Rojas, L., Vásquez, A.A., Domenech, I. & Robertson, L.J. (2010) Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends in Parasitology* **26**, 26–34.
- Ueta, M. (1980) Estudo morfométrico da concha de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **1**, 119–141.
- Van der Schalie, H. (1948) *The land and fresh water mollusks of Puerto Rico*. 70 pp. Miscellaneous Papers and Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan.



Article in preparation

**Genetic diversity of the two Lymneid snails vectors of fasciolosis in Cuba: *G. cubensis* and *Pseudosuccinea columella***

Antonio A. Vázquez<sup>1,2</sup>, Manon Lounnas<sup>1</sup>, Aliou Dia<sup>1</sup>, Jorge Sánchez<sup>2</sup>, Kevin Sartori<sup>1</sup>, Patrice David<sup>3</sup>, Jean-Pierre Pointier<sup>4</sup>, Sylvie Hurtrez-Boussès<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> MIVEGEC, UMR IRD 224 CNRS 5290 UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

<sup>2</sup> Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Apartado Postal 601, Marianao 13, La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive UMR 5175, 1919 Route de Mende, Campus CNRS, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>4</sup> USR 3278 CNRS-EPHE, Criobe Universite de Perpignan, 66860 Perpignan, France

<sup>5</sup> Département de Biologie-Ecologie (Faculté des Sciences) -cc 046- Université Montpellier, 4 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

## 1. Introduction

Lymnaeid snails have been the subject of many studies related to their role in the transmission of trematode parasites (Cichy et al., 2011). Among the diversity of parasites that use these species as intermediary hosts, the liver fluke *Fasciola hepatica* is of considerable interest (Correa et al., 2010). This fluke is the main responsible for Fasciolosis transmission, an emergent and re-emergent zoonosis in many countries, also considered a Neglected Tropical Disease by the World Health Organization (WHO, 2013).

The interaction of a particular parasite with its host has a close relation with the genetic diversity of both sides involved (Ganz and Ebert, 2010). Genetic diversity studies in these host-parasite systems may provide insights on the epidemiology of infectious diseases (de Meeûs et al., 2007). In the case of *F. hepatica* and the lymnaeid snails, the amount of genetic diversity is different regarding each species even when both are hermaphroditic. The fluke *F. hepatica* is known to display a considerable amount of allelic diversity probably due to a preferred cross-fertilization of individuals (Hurtrez-Boussès et al., 2004). Contrariwise, lymnaeid snails seem to prefer selfing (Meunier et al., 2004a) and thus have a relatively reduced genetic diversity (Hurtrez-Boussès et al., 2006; Meunier et al., 2001). Hence, the occurrence of a particular snail's genotype repeatedly in a large area could be the result of the selection of particular clones. These selective pressures can have their cause in some environmental abiotic factors but also can be based in the interspecific relations established among species like competence and parasitism. The latter is of particular interest since adaptation of hosts and parasites may be the result of genetic diversity coupled with the best outcome for this relation (Schulte et al., 2013). On the other hand, the lack of genetic diversity can be the result of genetic bottlenecks following introductions into new areas (Meunier et al., 2004b). A large number of lymnaeid snails worldwide are known for their susceptibility to host *F. hepatica* (Correa et al., 2010). Globally, *Galba truncatula* is considered one the main intermediary host of the liver fluke (Bargues and Mas-Coma, 1997). However, other species are particularly important in different regions such as *Galba cubensis* in the Caribbean (Vázquez et al., 2014), *Galba viator* in South America (Bargues et al., 2007; Kleiman et al., 2004) and *Pseudosuccinea columella* in Australia and Brazil (Marques et al., 2006; Molloy and Anderson, 2006). The latter species has also been reviewed due to the occurrence of natural resistant populations to *F. hepatica* miracidial infection in

Cuba (Gutiérrez et al., 2003a). At least five population of *P. columella* have been described to display an active immunological reaction against *F. hepatica* through miracidia encapsulation by the snail's haemocytes (Fernández-Caliénas et al., 2004; Vázquez et al., 2014).

*Pseudosuccinea columella* was first reported in Cuba under the name of *Lymnaea francisca* (Poey) in 1858. Populations of this species range from the westernmost region to the central-east of Cuba (Vázquez et al., 2009). On the other hand, *Galba cubensis* was described from Cuba (type locality) by Pfeifer (1839). This species is widely distributed in Cuba and exhibits a large ecological plasticity which allows its settlement in either natural or anthropic (usually highly contaminated) habitats (Vázquez et al. 2009).

The insularity of Cuba provides the possibility of studying the *F. hepatica*/Lymnaeidae system more attainable, given that introductions are relatively limited. Both species seem to have a close interaction with the liver fluke, of which *P. columella* seems to have a secondary role in the transmission (Vázquez et al., 2014).

The use of microsatellites to explore the genetic diversity of populations is widely used and recommended given its polymorphism and neutrality (Ashley and Dow, 1994). In the case of *P. columella*, eight microsatellite loci have been isolated and characterized that serve this goal (Nicot et al., 2008). More recently, Lounnas et al. (unpublished data) characterized fifteen microsatellites loci in *G. cubensis*. In this paper we explore for the first time the genetic diversity Cuban lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. Three populations of *P. columella* included in the study have a proved resistance to *F. hepatica* infection (Fernández-Caliénas et al., 2004; Vázquez et al., 2014). The objective pursued here is to better understand the population genetics of both snails hosts and the relation with the transmission of fasciolosis in Cuba.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Sampling of field populations

In the case of *G. cubensis* we sampled 12 populations covering most of the country of which three (Fulgencio Oroz, Vaquería 126 and Vaquería Alfa-Beta) correspond to fasciolosis areas. In the case of *P. columella*, 20 localities ranging from the westernmost to the central region of Cuba were sampled. Three populations (El Azufre, La Coca and

Babiney) presented phenotypic markers (mantle pigmentation) of resistant individuals (Gutiérrez et al., 2003b) and proved to be resistant to *F. hepatica* infection. The sampling was carried out according to the distribution described for this species in Vázquez et al. (2009) providing the most comprehensive selection (see each sampled species populations in figures 1 and 2). Samplings were done by hand using soft forceps and a sieve collecting up to 30 individuals where possible.

## 2.2. DNA extraction, amplification and genotyping of microsatellite loci

All snails were carefully dissected in the laboratory to screen for possible parasite infection and a piece of the foot's tissue was used for DNA extraction to avoid foreign contamination. The extraction of DNA was performed using Chelex resin (Estoup and Martin, 1996) slightly modified for 96 wells plates. Briefly described: a small portion of tissue was added to a mixture of 100 µL of Chelex®100 5% (Bio-Rad) and 5 µL of proteinase K (Promega) in each well. The plate is mixed in vortex and incubated overnight at 56°C and 10 min at 95°C. The mixture is centrifuged at 6000 x g for 6 min and the supernatant containing the DNA is collected and stored at -20°C until use.

In the case of *G. cubensis* amplified loci (Lounnas et al. unpublished data) were GCU01 (KT285812), GCU05 (KT285813), GCU13 (KT285814), GCU21 (KT285816), GCU23, GCU26, GCU27 (KT285819), GCU30 (KT285820), GCU31 (KT285821), GCU34 (KT285822), GCU37 (KT285823), and GCU39 (KT285824). Each locus was amplified through PCR using 2 µL of extracted DNA in a 20 µL of reaction volume containing 2.5 µL buffer 10X (Roche), 2 µL MgCl<sub>2</sub> 25 nmol/L, 2.4 µL dNTP 2 mmol/L (Invitro-gen/Life Technology), 1 µL of each primer (10 pmol) and 0.2 µL of *Taq* DNA polymerase 1U (Roche). Thermocycling was performed using a MJ-Research PTC 100 96-well and consisted of 10 min of initial denaturalization at 95°C, 40 cycles at 95°C for 30 s, annealing temperature at 55°C (each locus) for 30 s, 60s at 72°C and a final elongation step at 60°C for 10 min.

Amplified loci in *P. columella* (Nicot et al. 2008) were Pco01 (EU04295), Pco02 (EU049296), Pco07 (EU049299), Pco12 (EU049303), Pco13 (EU049304) and Pco20 (EU049309). Each locus was amplified through PCR using 1 µL of extracted DNA in a 10 µL of reaction volume containing 2 µL buffer 5X (Promega), 1 µL MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µL dNTP 2 mM (Invitro-gen/Life Technology), 0.2 µL of each primer (10 pmol) and 0.2 µL of *Taq* DNA polymerase 1U (Promega). Thermocycling was performed using a MJ-Research PTC 100 96-well and consisted of 10 min of initial denaturalization at 94°C,

30 cycles at 94°C for 30 s, annealing temperature at 55°C (each locus) for 30 s, 60s at 72°C and a final elongation step at 60°C for 30 min.

Primers were fluorescently labelled to be used in an ABI automated sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA). Amplified products for each individual were used for sequencing adding 1 µL of amplicon diluted 1/100 to a mix containing 15 µL of Hi-Di Formamide and 0.27 µL of internal size standards (GENESCAN 500 LIZ, Applera). Allele's lengths were obtained using GeneMapper® v. 4.0 software (Applied Biosystems™).

### *2.3. Population genetics analysis*

Current parameters of population genetics like the mean number of alleles ( $a$ ), the observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_s$ ) heterozigosities and  $F_{IS}$  were estimated for each locus. Pairwise differentiation between populations ( $F_{ST}$ ) was also tested. Calculations were computing using the software FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001). Bonferroni corrections were applied for multiple tests (Rice, 1984). The selfing rate ( $s$ ) for each population was calculated using the equation  $s = 2F_{IS}/(1+F_{IS})$  (Hartl and Clark, 1997). Identical multilocus genotypes (MLGTs) loci were identified based only on individuals with all microsatellite loci amplified and coded (one letter = one MLGT). Isolation by distance (Rousset, 1997) was explored through a Mantel test using the direct geographic distance between each pair of populations as  $\ln(\text{distance in km})$  and the genetic differentiation transformed as  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  using FSTAT v.0.9.3.2 (Goudet, 2001). Nei (1972; 1978) genetic distances between populations were estimated using Genetix (Belkhir et al., 2004). The obtained distance matrix was used to build a neighbour-joining network of all MLGTs in SplitsTree4 (Huson and Bryant, 2013).

### 3. Results

Dissection evidenced the infection by *F. hepatica* in two individuals from the locality of IPA. No infection by other trematode species was observed in any locality. A total of 257 *G. cubensis* and 329 *P. columella* were used considered for genetic analysis after dissection and DNA extraction.

#### 3.1. Genetic diversity of *G. cubensis*

We observed three monomorphic loci (GCU01, GCU13 and GCU39) in the studied populations. Remaining loci were polymorphic and a mean of 2.33 ( $\pm 0.49\text{SD}$ ) alleles was observed. Population genetic parameters for each locality are given in table 1. Mean allelic number par locus range, for every population, from 1 to 2.3 (mean 1.37). Four populations are completely monomorphic at the 12 studied loci while we detected at least one polymorphic locus in the remaining populations. Overall low allelic diversity was attained (maximum at Zanja Pastorita:  $2.33 \pm 0.49\text{SD}$ ). Expected heterozygosity (mean  $0.075 \pm 0.064\text{SD}$ ) and observed heterozygosity (mean  $0.1 \pm 0.114\text{SD}$ ) are also low and deviations from panmixia are high and significant in most populations (mean  $0.825 \pm 0.169\text{SD}$ ). Estimated selfing rates are consequently high usually over 79% (excepting Fulgencio Oroz: 64%).

**Table 1.** Mean allelic number (a), observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity,  $F_{IS}$  (probability after Bonferroni correction) and the estimation of selfing rates (s) for every population of *Galba cubensis* (N: number of analysed individuals).

Population	N	a ( $\pm \text{SD}$ )	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}(\text{p})$	s
Desagüe Distrito 1	24	1,000 ( $\pm 0$ )	0	0	NA	NA
Empresa Eléctrica	25	1,333 ( $\pm 0,49$ )	0,1 ( $\pm 0,3$ )	0,04 ( $\pm 0,06$ )	0,819 (<0,01)	0,900
Fulgencio Oroz	5	1,583 ( $\pm 0,49$ )	0,15 ( $\pm 0,36$ )	0,15 ( $\pm 0,23$ )	0,467 (NS)	0,636
Jibacoa	16	1,000 ( $\pm 0,51$ )	0,1 ( $\pm 0,3$ )	0,19 ( $\pm 0,22$ )	0,944 (<0,01)	0,971
La Julia	10	1,083 ( $\pm 0$ )	0	0	NA	NA
Parque Zoológico	25	1,333 ( $\pm 0,28$ )	0	0,04 ( $\pm 0,15$ )	1,000 (<0,01)	1
Río Cauto	23	1,583 ( $\pm 0,51$ )	0,1 ( $\pm 0,44$ )	0,09 ( $\pm 0,14$ )	0,917 (<0,01)	0,956
Río Yayabo	28	1,166 ( $\pm 0,38$ )	0,4 ( $\pm 0,99$ )	0,17 ( $\pm 0,21$ )	0,858 (<0,01)	0,923
Vaquería Alfa-Beta	30	1,583 ( $\pm 0,51$ )	0	0,06 ( $\pm 0,15$ )	1,000 (<0,01)	1
V126	18	1,416 ( $\pm 0,67$ )	0,2 ( $\pm 0,4$ )	0,08 ( $\pm 0,09$ )	0,706 (<0,01)	0,827
Zanja Ferrer	25	1,083 ( $\pm 0,29$ )	0,1 ( $\pm 0,3$ )	0,09 ( $\pm 0,13$ )	0,882 (<0,01)	0,937
Zanja Pastorita	28	2,333 ( $\pm 0,49$ )	0,05 ( $\pm 0,22$ )	0,01 ( $\pm 0,03$ )	0,657 (NS)	0,792

Regarding population differentiation, overall FST was 0.666 ( $p=0.011$ ). Table 2 gives pairwise FST values between populations where most populations are significantly

differentiated. Only Fulgencio Oroz did not differ from any other population but a small sample size ( $n=5$ ) was analysed. However, it is noteworthy the fact that the other two populations from fasciolosis areas (Vaquería 126 and Vaquería Alfa-Beta) do not differ from each other and are significantly different from the rest.

**Table 2.** Pairwise  $F_{ST}$  values between populations of *Galba cubensis* (populations: VAB = Vaquería Alfa-Beta, CA = Río Cauto, DD = Desagüe Distrito 1, EE = Empresa Eléctrica, FO = Fulgencio Oroz, JI = Jibacoa, LJ = La Julia, PZ = Parque Zoológico, RY = Río Yayabo, SB = Surgidero Batabanó, ZF = Zanja Ferrer, ZP = Zanja Pastorita).

	DD	EE	FO	JI	LJ	PZ	CA	RY	VAB	V126	ZF	ZP
DD	0											
EE	<b>0,884*</b>	0										
FO	0,791	<b>0,809*</b>	0									
JI	<b>0,756*</b>	<b>0,622*</b>	0,466	0								
LJ	<b>1,000*</b>	<b>0,834*</b>	0,823	0,700	0							
PZ	0,471	<b>0,820*</b>	0,628	<b>0,687*</b>	<b>0,902*</b>	0						
CA	<b>0,890*</b>	<b>0,880*</b>	0,628	0,733	0,844	<b>0,752*</b>	0					
RY	<b>0,406*</b>	0,000	0,414	0,444	0,597	<b>0,450*</b>	0,661	0				
VAB	<b>0,836*</b>	<b>0,661*</b>	0,645	<b>0,663*</b>	<b>0,680*</b>	<b>0,805*</b>	<b>0,780*</b>	<b>0,517*</b>	0			
V126	<b>0,811*</b>	<b>0,718*</b>	0,553	<b>0,616*</b>	<b>0,703*</b>	<b>0,754*</b>	<b>0,739*</b>	<b>0,490*</b>	0,192	0		
ZF	<b>0,780*</b>	<b>0,637*</b>	0,503	0,585	0,637	<b>0,749*</b>	0,737	0,461	0,060	-0,013	0	
ZP	<b>0,977*</b>	<b>0,764*</b>	0,897	<b>0,778*</b>	<b>0,906*</b>	<b>0,916*</b>	<b>0,905*</b>	<b>0,618*</b>	<b>0,425*</b>	<b>0,702*</b>	<b>0,585*</b>	0

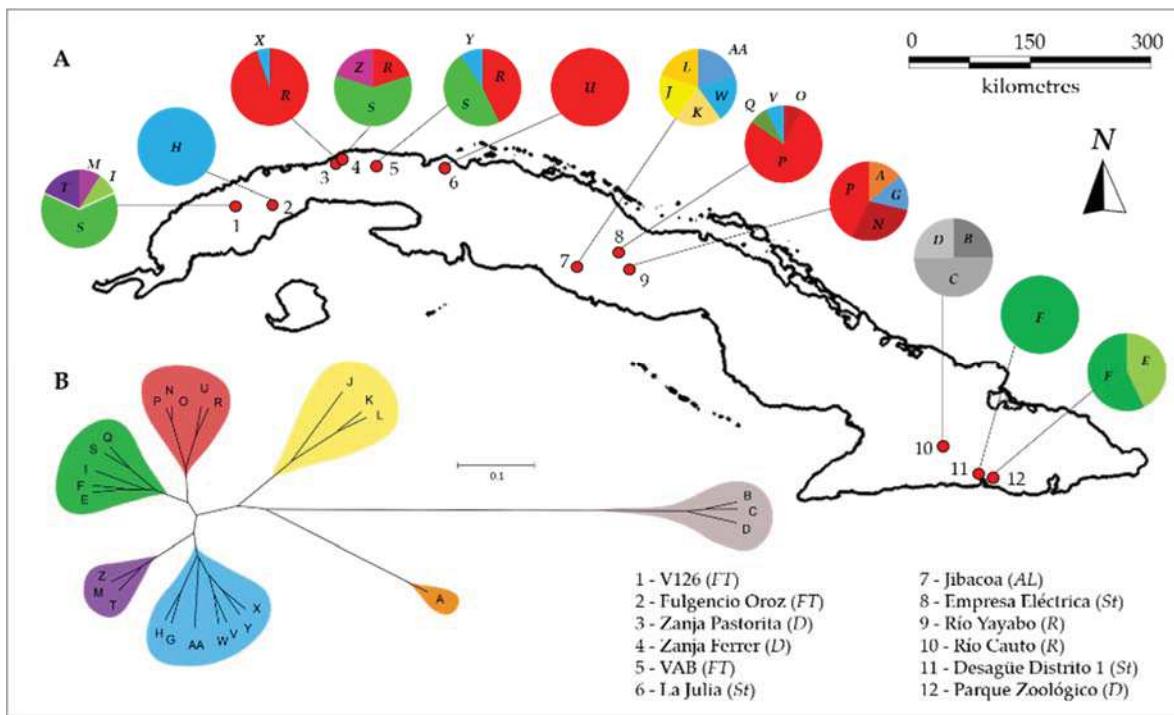
\*significant differentiation after the Bonferroni correction (adjusted  $P$  value = 0,000758)

At the level of multilocus genotypes (MLGT), a total of 27 different MLGTs were observed among the 12 studied populations of *G. cubensis* (table 3, figure 2). The number of MLGT per population range from 1-5 with an average of 2.75 ( $\pm 1.35$ ). Mean number of individuals at each MLGT is 4.22 ( $\pm 6.97$ ). Most MLGTs are within one population with the exception of four MLGTs (F, P, R, S) that are shared in several populations. Populations that share the same MLGT are usually geographically near and an overall isolation by distance was observed (Mantel test,  $R^2 = 17.09$ ,  $P = 0.0001$ ). It is worth to mention that most widespread MLGTs are also the most frequent within a single population.

**Table 3.** Populations, simple size and multilocus genotypes (MLGT) in *Galba cubensis* at 12 microsatellite loci. (N: analysed individuals after excluding those with at least one locus not amplified).

Population	N (number of different MLGT)	MLGT name (number of individuals)
Desagüe Distrito 1	11 (1)	<i>F</i> (11)
Empresa Eléctrica	13 (4)	<i>O</i> (1), <i>P</i> (10), <i>Q</i> (1), <i>V</i> (1)
Fulgencio Oroz	1 (1)	<i>H</i> (1)
Jibacoa	5 (5)	<i>J</i> (1), <i>K</i> (1), <i>L</i> (1), <i>W</i> (1), <i>AA</i> (1)
La Julia	4 (1)	<i>U</i> (4)
Parque Zoológico	14 (2)	<i>E</i> (6), <i>F</i> (8)
Río Cauto	4 (3)	<i>B</i> (1), <i>C</i> (2), <i>D</i> (1)
Río Yayabo	7 (4)	<i>A</i> (1), <i>G</i> (1), <i>N</i> (2), <i>P</i> (3)
Vaquería Alfa-Beta	21 (3)	<i>R</i> (9), <i>S</i> (10), <i>Y</i> (2)
V126	11 (4)	<i>I</i> (1), <i>M</i> (1), <i>S</i> (7), <i>T</i> (2)
Zanja Ferrer	5 (3)	<i>R</i> (1), <i>S</i> (3), <i>Z</i> (1)
Zanja Pastorita	18 (2)	<i>R</i> (17), <i>X</i> (1)

Figure 1A shows the geographic distribution of MLGTs in *G. cubensis*. The network obtained from Nei's genetic distances displays seven clusters of closely related genotypes. Note that those clusters are more or less spread in Cuba and only three populations (Jibacoa, Río Yayabo and Río Cauto) gather unique MLGTs of a single cluster (figure 1B).



**Figure 2.** Multilocus genotypes (MLGT) obtained from 12 microsatellite loci in *Galba cubensis*. A = Geographic distribution in Cuba of different MLGTs per population. B = Obtained joining-neighbour network using Nei's genetic distance from each MLGT (different colors correspond to different clusters). FT = flooded terrain, D = ditch, St = stream, AL = artificial lake, R = river.

### 3.2. Genetic diversity of *P. columella*

The six explored loci are polymorphic, especially Pco12 which displays seven different alleles in Cuba. Population genetic parameters are presented in table 4. Allelic diversity is very low in the 20 studied populations (mean  $2.034 \pm 0.646\text{SD}$ ). Five populations (Pilón, El Antojo, Puesto de Mando, Guillén-Boca and Arroyo) are completely monomorphic at the six loci and are scattered along the studied area. Noteworthy, the two population with the highest allelic variation matched two resistant populations to *F. hepatica* infection (La Coca and Babiney:  $2.17 \pm 0.75\text{SD}$ ). However, the third studied resistant population at El Azufre showed a lower diversity ( $1.17 \pm 0.41\text{SD}$ ).

Expected (mean  $0.1 \pm 0.09\text{SD}$ ) and observed ( $0.03 \pm 0.056\text{SD}$ ) heterozygosity are very low. With the exception of Río Arimao where both values of heterozygosity are similar ( $\text{FIS} = 0.038$  NS), all other populations have high and significant values of FIS after Bonferroni correction (mean  $\text{FIS} = 0.667 \pm 0.313\text{SD}$ ) and hence estimated selfing rates are strong (>64%).

**Table 4.** Mean allelic number (a), observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity,  $F_{IS}$  (probability) and estimated selfing rates (s) for each population of *Pseudosuccinea columella* (N: number of analysed individuals).

Population	N	a ( $\pm DS$ )	$H_o$ ( $\pm DS$ )	$H_e$ ( $\pm DS$ )	$F_{IS}(p)$	s
'La Coca	37	2,17( $\pm 0,75$ )	0,056 ( $\pm 0,074$ )	0,304( $\pm 0,227$ )	0,816 (<0,01)	0,90
'Babiney	26	2,17( $\pm 0,75$ )	0,068 ( $\pm 0,059$ )	0,249( $\pm 0,197$ )	0,726 (<0,01)	0,84
IPA	19	2,00( $\pm 1,10$ )	0,068 ( $\pm 0,121$ )	0,127( $\pm 0,164$ )	0,469 (<0,01)	0,64
Parque Lenin	26	1,67( $\pm 0,82$ )	0,019 ( $\pm 0,045$ )	0,087( $\pm 0,104$ )	0,786 (<0,01)	0,88
Río Arimao	13	1,83( $\pm 0,75$ )	0,249 ( $\pm 0,259$ )	0,239( $\pm 0,267$ )	0,038 (NS)	0,08
Río Hondo	15	1,50( $\pm 0,84$ )	0,025 ( $\pm 0,039$ )	0,092( $\pm 0,191$ )	0,733 (<0,01)	0,85
Río Manaquita	15	1,50( $\pm 0,84$ )	0,028 ( $\pm 0,044$ )	0,149( $\pm 0,25$ )	0,814 (<0,01)	0,90
Río Yayabo	20	1,33( $\pm 0,52$ )	0,01 ( $\pm 0,025$ )	0,174( $\pm 0,27$ )	0,940 (<0,01)	0,97
Tío Pancho	22	1,17( $\pm 0,41$ )	0,008 ( $\pm 0,019$ )	0,008( $\pm 0,02$ )	0 (NS)	1,00
Vaquería 7	13	1,33( $\pm 0,52$ )	0,031 ( $\pm 0,049$ )	0,101( $\pm 0,212$ )	0,689 (<0,05)	0,82
Vegas Grandes	10	1,33( $\pm 0,52$ )	0,05 ( $\pm 0,083$ )	0,117( $\pm 0,24$ )	0,571 (NS)	0,73
Arroyo	16	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
Puesto de Mando	6	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
El Antojo	6	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
'El Azufre	19	1,17( $\pm 0,41$ )	0	0,076( $\pm 0,186$ )	1 (<0,01)	1,00
Guillén-Boca	15	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
Río Central	7	1,50( $\pm 0,84$ )	0,048 ( $\pm 0,073$ )	0,091( $\pm 0,163$ )	0,478 (NS)	0,65
Matadero de Aves	24	1,50( $\pm 0,84$ )	0,007 ( $\pm 0,017$ )	0,17( $\pm 0,263$ )	0,959 (<0,01)	0,98
Pilón	6	1,00( $\pm 0,00$ )	0	0	-	1,00
San Juan y Martínez	14	1,17( $\pm 0,41$ )	0	0,024( $\pm 0,058$ )	1 (NS)	1,00

r : resistant populations of *P. columella* to *F. hepatica* infection

Overall FST was 0.339 (p = 0.203). Table 5 gives pairwise values of FST of populations. Significant differentiation was observed particularly in resistant populations (La Coca, Babiney and El Azufre) which not only differed from susceptible populations, but also from each other. Only susceptible Matadero Aves differed from other five susceptible populations.

**Table 5.** Estimations of pairwise genetic differentiation of populations ( $F_{ST}$ ) in *Pseudosuccinea columella* (populations : LC = La Coca, BA = Babiney, PL = Parque Lenín, RA = Río Arimao, RH = Río Hondo, RM = Río Manquita, RY = Río Yayabo, TP = Tío Pancho, V7 = Vaquería 7, VG = Vegas Grandes, AR = Arroyo, PM = Puesto de Mando, AN = El Antojo, AZ = El Azufre, GB = Guillén-Boca, RC = Río Central, MA = Matadero Aves, PI = Pilón, SJM = San Juan y Martínez).

	LC	BA	IPA	PL	RA	RH	RM	RY	TP	V7	VG	AR	PM	AN	AZ	GB	RC	MA	PI	SJM
LC	0,000																			
BA	0,452*	0,000																		
IPA	0,548*	0,694*	0,000																	
PL	0,598*	0,730*	0,001	0,000																
RA	0,321*	0,564	0,187	0,301	0,000															
RH	0,560	0,693	0,045	0,009	0,272	0,000														
RM	0,501*	0,664*	0,108	0,222	0,095	0,221	0,000													
RY	0,548*	0,697*	0,248	0,338	0,289	0,307	0,294	0,000												
TP	0,616*	0,748*	0,010	-0,023	0,344	0,149	0,271	0,353	0,000											
V7	0,524*	0,686*	0,020	0,120	0,141	0,168	-0,039	0,283	0,167	0,000										
VG	0,497	0,664	0,072	0,209	0,105	0,250	-0,107	0,272	0,314	-0,116	0,000									
AR	0,623*	0,771*	0,090	0,033	0,460	0,161	0,432	0,440	-0,007	0,386	0,587	0,000								
PM	0,552*	0,709*	0,006	-0,037	0,310	0,054	0,281	0,318	-0,041	0,224	0,385	NA	0,000							
AN	0,552*	0,709*	0,006	-0,037	0,310	0,054	0,281	0,318	-0,041	0,224	0,385	NA	NA	0,000						
AZ	0,301	0,590*	0,856*	0,871*	0,742*	0,862	0,842*	0,823*	0,934*	0,872*	0,873	0,932*	0,905*	0,905*	0,000					
GB	0,617*	0,766*	0,085	0,029	0,449	0,153	0,421	0,431	-0,008	0,374	0,573	NA	NA	NA	0,930*	0,000				
RC	0,521*	0,685*	-0,036	-0,004	0,203	0,046	0,163	0,152	-0,017	0,084	0,154	0,154	0,022	0,022	0,870*	0,144	0,000			
MA	0,560*	0,703*	0,180*	0,253	0,280*	0,234	0,266*	-0,028	0,250	0,230*	0,235*	0,320	0,220	0,220	0,812*	0,313	0,082	0,000		
PI	0,552*	0,709*	0,006	-0,037	0,310	0,054	0,281	0,318	-0,041	0,224	0,385	NA	NA	NA	0,905*	NA	0,022	0,220	0,000	
SJM	0,597*	0,748*	0,071	0,028	0,385	0,111	0,362	0,396	0,017	0,295	0,448	0,010	-0,075	-0,075	0,912*	0,005	0,074	0,291	-0,075	0,000

\*significant differentiation after the Bonferroni correction (adjusted  $P$  value = 0,000758)

: resistant populations of *P. columella* to *F. hepatica* infection

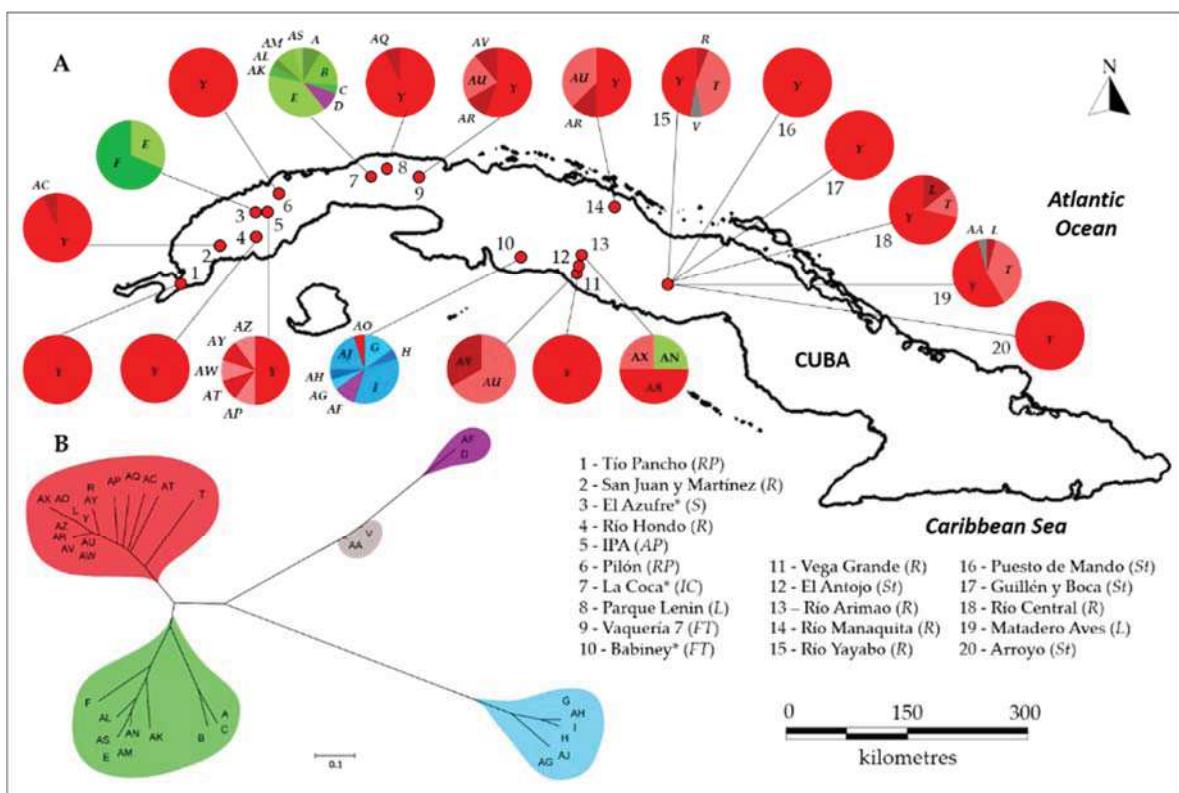
Multilocus genotyping (at the six microsatellites loci) showed the existence of 36 different MLGTs (table 6). Mean number in susceptible populations is 2.764 ( $\pm 1.562\text{SD}$ ) while a higher average of 6.333 ( $\pm 3.785\text{SD}$ ) was attained in resistant populations. Difference between each group of populations was found statistically significant (t-Student value 2.93;  $P = 0.008$ ). Eighteen MLGTs were observed in resistant individuals of which only two (E and F) are shared in two populations (El Azufre and La Coca). MLGT Y is the most frequent in Cuba and is the only observed in monomorphic populations. It is interesting to highlight the fact that the two infected individuals from IPA and those reported infected by Gutiérrez et al. (2011) at Pilón shared the same MLGT Y. A different MLGT T was observed only in the easternmost populations (Río Manaquita, Río Central and Matadero Aves). Remaining MLGTs are considered rare and differ from one another by single or few alleles (figure 2A).

**Table 6.** Populations, sample size and multilocus genotypes (MLGT) in *Pseudosuccinea columella* at 6 microsatellite loci. (N: analysed individuals after excluding those with at least one locus not amplified).

Population	N (nombre de GTML différents)	Nom du GTML (nombre d'individus)
Tío Pancho	4 (1)	Y (4)
San Juan y Martínez	14 (2)	Y (13), AC (1)
El Azufre	19 (2)	E (6), F (13)
Río Hondo	2 (1)	Y (2)
IPA	9 (5)	Y (5), AP (1), AT (1), AW (1), AY (1), AZ (1)
Pilón	6 (6)	Y (6)
La Coca	23 (9)	A (2), B (4), C (1), D (2), E (9), AK (1), AL (1), AM (2), AS (1)
Parque Lenin	13 (2)	Y (12), AQ (1)
Vaquería 7	9 (4)	Y (5), AR (1), AU (2), AV (1)
Babiney	20 (8)	G (3), H (1), I (7), AF (2), AG (1), AH (1), AJ (4), AO (1)
Vegas Grandes	3 (2)	AU (2), AV (1)
El Antojo	10 (4)	Y (6), AN (1), AR (2), AX (1)
Río Arimao	4 (3)	AN (1), AR (2), AX (1)
Río Manaquita	8 (3)	Y (4), AR (1), AU (3)
Río Yayabo	17 (4)	R (1), T (7), V (1), Y (8)
Puesto de Mando	6 (1)	Y (6)
Guillén-Boca	15 (1)	Y (15)
Río Central	7 (3)	L (1), T (1), Y (5)
Matadero de Aves	16 (4)	L (1), T (1), Y (13), AA (1)
Arroyo	16 (1)	Y (16)

: resistant populations of *P. columella* to *F. hepatica* infection

Figure 2A shows the distribution of the 36 MLGTs in Cuba. Note MLGT Y widespread in most sampled localities and absent from resistant populations and two susceptible (Vegas Grandes and Río Arimao). The obtained MLGT network from Nei's genetic distance displays three majoritarian clusters and two small associations gathering only two MLGTs each (figure 2B). Every MLGT from susceptible individuals gathered into two clusters (red and grey) whereas red cluster represents the overwhelming majority of susceptible MLGT. Two major (green and blue) and a small (purple) clusters contains all MLGTs from resistant individuals. Only genotype AN from Río Arimao pooled together with MLGTs from resistant populations of La Coca and El Azufre (green cluster).



**Figure 3.** Multilocus genotypes (MLGT) from six 6 microsatellite loci of *Pseudosuccinea columella*. A = Geographic distribution of different MLGT per population in Cuba. B = Joining-neighbour network obtained from Nei's genetic distance of each MLGT (different colors correspond to different clusters). FT = flooded terrain, RP = rice paddy, S = spring, AP = artificial pond, R = river, PP = permanent pond, IC = irrigation channel, St = stream, L = lake.

## 4. Discussion

### 4.1. Population genetics of *G. cubensis* and its relation with *F. hepatica* transmission

Transmission of *F. hepatica* by *G. cubensis* is circumscribed to the neotropical region and probably to the southern nearctic region (Cruz-Reyes an Malek, 1987; Correa et al. 2011). Many transmission sites where *G. cubensis* occur are well documented in USA (Kaplan et al. 1997) and Cuba (Ferrer et al. 1985), as well as in South America (Pointier et al. 2009). Population genetics studies may only be capable of providing insights of genetic diversity related to the circulation of particular strains of *F. hepatica* at each region.

The low allelic diversity per population as well as the strong deviations from panmixia in *G. cubensis* suggest a highly selfing rate in this species (mean  $0.911 \pm 0.11\text{SD}$ ). Other species from the same genus *Galba* are known for a marked preference to selfing such as *G. truncatula* (Meunier et al. 2004a), *G. schirazensis* (Correa, 2010) as well other lymnaeid species like *P. columella* (Nicot et al. 2008) and *Omphiscola glabra* (Hurtrez-Boussès et al. 2006).

While *G. cubensis* was first described from Cuba (Pfeiffer, 1839), type locality may not match its true origin. However, it is reasonable to think of an ancient evolution time in the island that explain the observed genetic diversity (27 MLGTs in 12 populations).

Also, FST values show a clear differentiation of most populations. This could be explained either through a divergence between populations from a single introduction event, or through different and independent introductions. In case of repeated introductions, we could expect different MLGTs and an intra-population diversity as low as the introduction date is more recent (Roman and Darling, 2007). Contrarily, the fact that only a few monomorphic populations were detected and since most MLGTs are alike (only a single or a few loci differed), support the hypothesis of gradual differentiation from one (or a few) strains anciently arrived in Cuba. In fact, from a single original population the increase of different alleles per locus may occur through selected mutations (Roman and Darling, 2007). Besides, the observed isolation by distance (populations are more alike as more geographically near) favour a slow colonisation of *G. cubensis* from one initial introduced population.

The fact that we did not detect significant differentiation between populations in fasciolosis areas is worth of future studies to test whether it is the result of a single

random event (populations are each other near), or they comprise genotypes more susceptible/compatible with circulating strains of *F. hepatica*.

#### *4.2. Genetic diversity, distribution pattern of resistant and susceptible P. columella and relation with fasciolosis transmission in Cuba*

Results observed in this study are in accordance with previous works in this species: very low diversity and strong deviations from panmixia which is consistent with high selfing rates (Nicot et al. 2008; Lounna et al. submitted). However, three populations (IPA, Río Central and Río Arimao) showed lower selfing rates. Several studies have indicated that cross-fertilization may represent a selective advantage when populations are under severe parasitic pressures (Lively, 1987; Agrawal and Lively, 2001).

Conversely, reproduction by selfing can be selected in stochastic environments (Baker, 1967) providing reproduction even if only one individual survive severe conditions. Thus, we should expect lower selfing rates in stable habitats or endemic fasciolosis areas. The locality of IPA match both criteria since it was previously suggested as a fasciolosis transmission site by Gutiérrez et al. (2005a), and consists of a permanent pond used to stock water. Also, the two found infected individuals during dissection belonged to this locality. The other two localities are recognised as fasciolosis areas (IMV, 2013).

Contrarily to what was observed in *G. cubensis*, most populations did not differ and only resistant *P. columella* showed significant FST values. Previous studies of Fernandez-Calienes et al. (2004) showed that these populations differed from susceptible and Gutiérrez et al. (2003a) detected clear different RAPD profiles using 17 different primers.

The low genetic diversity observed (five monomorphic populations) and the widespread of MLGT Y in Cuba, can be explained by a recent genetic bottleneck after the introduction of this strain in Cuba followed by a fast expansion into different zones of the island. A similar case has been documented in *G. truncatula* in the Bolivian Altiplano (Meunier et al. 2001). Also, a recent world-scale study comprising several populations of *P. columella* considered one of the observed MLGT (T) as invasive and was observed in Colombia, Peru, Venezuela, South Africa and the Indian Ocean (Lounnas et al. submitted). We observed this very same genotype in two populations (Río Central and Matadero Aves). However, our study shows that two out of three resistant populations of *P. columella* (La Coca and Babiney) present higher genetic

diversity than the other studied populations. The third population (El Azufre), consist of an isolated spring probably severed by continuous genetic bottlenecks that are not impacting the others placed in open flooded terrains probably more stables.

Introductions of *P. columella* are known to occur from random events such as floods or linked to human activities like the aquarium plant trade (Madsen and Frandsen, 1989; Pointier et al. 2007). The date of introduction of *P. columella* in Cuba is unknown, but it was first reported in 1858 under the name of *Lymnaea francisca* (Poey). It is then reasonable to think in a first introduction around the early 19<sup>th</sup> century. Gutiérrez et al. (2005b) suggested a resistance associated cost of resistant populations to *F. hepatica* infection which drive us to think that it could only be maintained by a constant selective pressure by this parasite. Earliest descriptions of *F. hepatica* in Cuba date from 1930 (Kourí an Arenas, 1931). Even if the liver fluke may have been some time before in cattle, it could correspond to an intensification period of infection in Cuba. The parasite may have since then exerted a strong pressure over this species that selected resistant individuals. More recently introduction carrying MLGTs T and Y may have occurred with the latter spreading fast in the island. This recently introduced MLGT Y may in fact present itself as ecological adaptable and highly compatible with *F. hepatica*.

The introductions of vectors are severe issues because of the epidemiological risks. In fact, recently introduced populations suffer strong genetic bottlenecks that drag off former genetic diversity preventing them to acquire resistance to local parasites. Also, many are highly invasive, colonizing a number of available sites. If we admit a resistance related cost in *P. columella*, as suggested by Gutiérrez et al. (2005b), it is highly improbable that genotypes with invading abilities also correspond to those resistant to *F. hepatica*. It is thus plausible that the ability of *P. columella* to invade represents a true danger in the propagation of the liver fluke. Transmission of *F. hepatica* by introduced populations of this species is confirmed in Brazil and Argentina (Marques et al. 2006; Zarco et al. 2011), Egypt (Grabner et al. 2014) and Australia (Molloy and Anderson, 2006). It is also presumed in South Africa (Kock et al. 2003) and in the Pacific islands where it has been introduced including Hawaii (Cowie, 2001; Pointier and Marquet, 1990). In any case, it is of major importance to maintain an active surveillance the new introductions of *P. columella* in different and distant world regions.

## Acknowledgments

This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (BEST grant to A.A.V.) and a doctoral fellowship from the University of Montpellier to ML.

## References

- Agrawal, A. & Lively, C. (2001) Parasites and the evolution of self-fertilization. *Evolution*, 55, 869-879.
- Ashley, M. & Dow, B. (1994) The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications. In *Molecular ecology and evolution: approaches and applications* Schierwater, B., Wagner, G. & DeSalle, R. (Eds.). Basel, Switzerland, Birkhauser Verlag.
- Baker, H. (1967) Support for Baker's law – as a rule. *Evolution*, 21, 853-856.
- Bargues, M. & Mas-Coma, S. (1997) Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18s rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 569-577.
- Bargues, M., Artigas, P., Mera y Sierra, R., Pointier, J. & Mas-Coma, S. (2007) Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101, 621-641. doi: 10.1179/136485907X229077.
- Belkhir, K., Borsig, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Catch, F. (2004) GENETIX 4.05.2. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR, 5000.
- Cichy, A., Faltýnková, A. & Zbikowska, E. (2011) Cercariae (Trematoda, Digenea) in European freshwater snails - a checklist of records from over one hundred years. *Folia Malacologica*, 19, 165-189. doi: 10.2478/v10125-011-0023-6.
- Correa, A. (2010) Analyse de l'interaction hôte-parasite sous différentes approches évolutives : le système Lymnaeidae (Gastropoda)–Fasciolidae (Trematoda). PhD Thesis, Université de Montpellier 2.
- Correa, A., Escobar, J., Durand, P., David, P., Jarne, P., Pointier, J. & Hurtrez-Boussès, S. (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *Evolutionary Biology*, 10, 381. doi: 10.1186/1471-2148-10-381.
- Correa, A., Escobar, J., Noya, O., Velázquez, L., González-Ramírez, C., Hurtrez-Boussès, S. & Pointier, J. (2011) Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1978-1988. doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.003.
- Cowie, R. (2001) Invertebrate invasions on Pacific Islands and the replacement of unique native faunas: a synthesis of the land and freshwater snails. *Biological Invasions*, 3, 119-136.

Cruz-Reyes, A. & Malek, E. (1987) Suitability of six lymnaeid snails for infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 24, 203-210. doi: 10.1016/0304-4017(87)90041-0.

de Meeûs, T., McCoy, K., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S. & Renaud, F. (2007) Population genetics and molecular epidemiology or how to “de’busquer la bête”. *Infection, Genetics and Evolution*, 7, 308-332. doi: 10.1016/j.meegid.2006.07.003.

Estoup, A. & Martin, O. (1996) Marqueurs microsatellites: isolement à l'aide de sondes non-radioactives, caractérisation et mise au point [WWW document].  
<http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm> [accessed on September 2015].

Fernández-Caliénas, A., Fraga, J., Pointier, J., Yong, M., Sánchez, J., Coustau, C., Gutiérrez, A. & Théron, A. (2004) Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica*, 92, 83-87. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.05.014.

Ferrer, J., Perera, G. & Yong, M. (1985) Estudio de los moluscos fluviales de una localidad afectada por un brote de fascioliasis. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 37, 155-160.

Ganz, H. & Ebert, D. (2010) Benefits of host genetic diversity for resistance to infection depend on parasite diversity. *Ecology*, 91, 1263-1268.

Goudet, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. <<http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>>.

Grabner, D., Mohamed, F., Nachev, M., Méabed, E., Sabry, A. & Sures, B. (2014) Invasion Biology Meets Parasitology: A Case Study of Parasite Spill-Back with Egyptian *Fasciola gigantica* in the Invasive Snail *Pseudosuccinea columella*. *PLoS ONE*, 9, e88537. doi: 10.1371/journal.pone.0088537.

Gutiérrez, A., Hernández, D. & Sánchez, J. (2005a) Variation of snail's abundance in two water bodies harboring strains of *Pseudosuccinea columella* resistant and susceptible to *Fasciola hepatica* miracidial infection, in Pinar del Río Province, Cuba. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 725-727.

Gutiérrez, A., Pointier, J., Fraga, J., Jobet, E., Modat, S., Pérez, R., Yong, M., Sánchez, J., Loker, E. & Théron, A. (2003a) *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Experimental Parasitology*, 105, 211-218. doi: 10.1016/j.exppara.2003.12.006.

Gutiérrez, A., Pointier, J., Yong, M., Sánchez, J. & Théron, A. (2003b) Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. *Parasitology Research*, 90, 129-134. doi: 10.1007/s00436-002-0824-z.

Gutiérrez, A., Vázquez, A., Hevia, Y., Sánchez, J., Correa, A., Hurtrez-Boussès, S., Pointier, J. & Théron, A. (2011) First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a

wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. *Journal of Helminthology*, 85, 109-111. doi: 10.1017/S0022149X10000350.

Gutiérrez, A., Yong, M., Sánchez, J., Wong, L. & Pointier, J. (2005b) Competition between *Fossaria cubensis* and two isolates (susceptible and resistant to *Fasciola hepatica*) of *Pseudosuccinea columella* under laboratory conditions. *Haliotis*, 35, 1-11.

Hartl, D. & Clark, A. (1997) *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc.

Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guégan, J., Meunier, C., Bargues, M., Mas-Coma, S. & Renaud, F. (2004) Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Molecular Ecology*, 4, 689-690. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00786.x.

Hurtrez-Boussès, S., Pendino, A., Bernabé, C., Durand, P., Rondelaud, D., Durand, C., Meunier, C., Hurtrez, J. & Renaud, F. (2006) Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 1643-1648.

Huson, D. & Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 254-267.

IMV (2013) Informe Anual del Instituto de Medicina Veterinaria. La Habana, Cuba, Ministerio de Agricultura.

Kaplan, R., Dame, J., Reddy, G. & Courtney, C. (1997) The Prevalence of *Fasciola hepatica* in its Snail Intermediate Host Determined by DNA Probe Assay. *International Journal for Parasitology*, 27, 1585-1593.

Kleiman, F., Pietrovsky, S., Paraense, W. & Wisinivesky-Colli, C. (2004) Southernmost Finding of *Lymnaea viatrix* Orbigny, 1835 (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate Host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea), in Urban and Rural Areas of Patagonia, Argentina. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 23-24.

Kock, K., Wolmarans, C. & Bornman, M. (2003) Distribution and habitats of the snail *Lymnaea truncatula*, intermediate host of the liver fluke *Fasciola hepatica*, in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 74, 117-122.

Kourí, P. & Arenas, R. (1931) Dos casos autóctonos de Distomatosis hepática humana producida por la *Fasciola hepatica*. *Vida Nueva*, 28, 389-451.

Lively, C. (1987) Evidence from a New Zealand snail for the maintenance of sex by parasitism. *Nature*, 328, 519-521.

Madsen, H. & Frandsen, F. (1989) The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, 46, 139-146.

Marques, P., Caldeira, R., Bernadete, M., Zech, P., Aires, M., Müller, G. & dos Santos, O. (2006) Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Acta Tropica*, 97, 339-345. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.01.003.

- Meunier, C., Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Rondelaud, D. & Renaud, F. (2004b) Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Ecology*, 13, 2535-2543. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02242.x.
- Meunier, C., Hurtrez-Boussès, S., Jabbour-Zahab, R., Durand, P., Rondelaud, D. & Renaud, F. (2004a) Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity*, 92, 316-322. doi: 10.1038/sj.hdy.6800410.
- Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Bargues, M., Mas-Coma, S., Pointier, J., Jourdane, J. & Renaud, F. (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular Ecology*, 10, 1333-1340.
- Molloy, J. & Anderson, G. (2006) The distribution of *Fasciola hepatica* in Queensland, Australia, and the potential impact of introduced snail intermediate hosts. *Veterinary Parasitology*, 137, 62-66. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.12.024.
- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106, 283-292.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 583-590.
- Nicot, A., Dubois, M., Debain, C., David, P. & Jarne, P. (2008) Characterization of 15 microsatellite loci in the pulmonate snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Molecular Ecology*, 8, 1281-1284. doi: 10.1111/j.1755-0998.2007.02065.x.
- Pfeiffer, L. (1839) Bericht über die Ergebnisse meine Reise nach Kuba im Winter 1838-1839. *Archiv für Naturgeschichte*, 6, 25-261.
- Pointier, J. & Marquet, G. (1990) Taxonomy and distribution of freshwater mollusks of French Polynesia. *The Japanese Journal of Malacology*, 48, 147-160.
- Pointier, J., Coustau, C., Rondelaud, D. & Théron, A. (2007) *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitology Research*, 101, 1389-1392. doi: 10.1007/s00436-007-0656-y.
- Pointier, J., Noya, O., Alarcón de Noya, B. & Théron, A. (2009) Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* in Venezuela. *Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 790-796.
- Rice, H. (1984) Analysing tables of statistical Tests. *Evolution*, 43, 223-225.
- Roman, J. & Darling, J. (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 454-564. doi: 10.1016/j.tree.2007.07.002.
- Rousset, F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145, 1219-1228.

Schulte, R., Makus, C. & Schulemburg, H. (2013) Host–parasite coevolution favours parasite genetic diversity and horizontal gene transfer. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 1836–1840. doi: 10.1111/jeb.12174.

Vázquez, A., Sánchez, J. & Hevia, Y. (2009) Distribución y preferencia de hábitats de moluscos hospederos intermedios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61, 248–253.

Vázquez, A., Sánchez, J., Pointier, J., Théron, A. & Hurtrez-Boussès, S. (2014) *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *Journal of Helminthology*, 88, 434–440. doi: 10.1017/S0022149X13000382.

WHO (2013) Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. *WHO Technical Report Series*, 152p.

Zarco, A., Fantozzi, M. & Cuervo, P. (2011) Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeidae, *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817): First record in Córdoba province, central Argentina. *Check List*, 7, 391–393.



## **Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci in an intermediate host of fascioliasis, the freshwater snail *Galba cubensis* (Mollusca, Gastropoda)**

Manon Lounnas<sup>1</sup>, Antonio-Alejandro Vazquez-Perera<sup>1,2</sup>, Pilar Alda<sup>1,3</sup>, Kévin Sartori<sup>1</sup>, René Galzin<sup>4</sup>, Jean-Pierre Pointier<sup>5</sup>, Patrice David<sup>6</sup>, Sylvie Hurtrez-Boussès<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recherche pour le Développement, MIVEGEC, UM1 – CNRS 5290 – IRD 224 Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Centre IRD, Montpellier, France.

<sup>2</sup> Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CONICET-UNLP), Boulevard 120 s/n e/61 y 62, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup> École Pratique des Hautes Études, Laboratoire d'Icthyoécologie tropicale et méditerranéenne (Centre National de la Recherche Scientifique, Unité 1453), Université de Perpignan, F-66860 Perpignan Cedex, France.

<sup>5</sup> Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive UMR 5175, 1919 Route de Mende, Campus CNRS, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>6</sup> USR 3278 CNRS–EPHE, CRIOBÉ Université de Perpignan, Perpignan, France.

<sup>7</sup> Département de Biologie–Ecologie, Faculté des Sciences, Université Montpellier 2, Montpellier, France.

## Introduction

Lymnaeidae are small freshwater snails (Basommatophora) distributed across the world (Hubendick 1951; Burch 1982; Brown 1994; Correa et al. 2010). There are of major importance, both in evolutionary biology and in medical and veterinary science, since they act as intermediate host of a great diversity of digeneans (Platyhelminths, Trematoda)—71 digenetic species belonging to 13 families have been described to be transmitted by at least one of the 100 species of lymneids (Dawes 1968). Among these parasites, Schistosomatidae (Horák and Kolárová, L 2001), Echinostomatidae (Graczyk and Fried 1998), Fasciolidae, and Paramphistomatidae have an impact on human or veterinary health. One of the most striking cases is that of the *Fasciola hepatica* that represents a very high burden for human populations worldwide (Cotruvo et al. 2004). Indeed, fasciolosis occurs at least in 50 countries on the five continents and is one of the food-borne trematodosis most widely distributed in latitude, longitude, and altitude (Mas-Coma et al. 2005). It has long been considered as a true veterinary problem due to its impacts on livestock that cause a great economic loss (Dalton 1999). Nonetheless, it has been recognized as a severe health problem by the end of the 20<sup>th</sup> century (Hurtrez-boussès et al. 2001). At least twenty millions of humans beings are infected and more than 180 millions are exposed to the risk of infection. Moreover, prevalences have considerably increased during the past decade due to climate change and changing practices (van Dijk et al. 2008) and cases of emergence or reemergence have been reported in different countries: Bolivia, Peru, Egypt, and Iran. Despite this gloomy picture, fasciolosis is still remaining one of the most neglected disease (Franco-Paredes and Santos-Preciado 2015). Difficulties in understanding the life cycle of *F. hepatica* are caused by the high diversity of both definitive (vertebrates; see Hurtrez-Boussès et al. 2001) and intermediate hosts. Indeed, Correa et al. (2010) estimated that half of the lymneid species can act as potential vectors of fasciolosis. A better knowledge of transmission of this disease and of ecological characteristics of its vectors is therefore a pressing challenge in order to assess epidemiological risks and to support efficient strategies of control.

For this purpose, studies of genetic diversity have been conducted on some vectors like *Galba truncatula* (Trouvé et al. 2000; Meunier et al. 2001; Trouvé et al. 2003; Meunier et al. 2004), *Omphiscola glabra* (Hurtrez-Boussès et al. 2005), *Pseudosuccinea columella* (Nicot et al. 2008; Correa et al. 2010) or *Galba schirazensis* (Lounnas et al., *in preparation*). Although *Galba cubensis* has been proved to play a crucial role in fasciolosis transmission in Cuba (Gutiérrez et al. 2000; Vázquez et al. 2014; Alba et al. 2015), the population biology of this vector had never been studied so far. Originally described in Cuba by Pfeiffer in 1839 (Pfeiffer 1839), this species has been recorded in other countries of Caribbean area and Latin America (see review in Correa et al. 2011): Colombia, Caribbean Islands, Mexico, Uruguay, and Venezuela.

The aim of this study is to provide a first characterization of population genetics of *Galba cubensis*. Thus, we developed polymorphic microsatellite markers and used them on a panel of 13

populations of *G. cubensis* sampled in Cuba, Colombia, Antilles, Ecuador, and Venezuela. Furthermore, we tested cross amplification in three closely related species (Correa et al. 2010; Correa et al. 2011) that are also vectors of fasciolosis (Sanabria et al. 2012): *Galba truncatula*, *Galba viator*, and *Galba neotropica*.

## Material and Methods

### Isolation and characterization of microsatellite loci

The foot tissues of nine adult snails were pooled and genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Samples came from the three following sites (three snails per site): Grande Ravine in Guadeloupe (N 16°23'10.3" W 61°28'40.2" ), Alquizar in Cuba (N 22°43'52.3" W 82°39'33.5") and La Habana in Cuba (N 23°1'12.7" W 82°21'15.8").

Microsatellite libraries were performed and analyzed by the Geno Sat method (GenoScreen) using very high speed sequencing (GS-FLX®, Roche Diagnostic), following protocols described by Malausa et al (2011). Briefly, the DNA sample was fragmented and enriched with 8 oligoprobes (TG, TC, AAC, AAG, AGG, ACG, ACAT, ACTC). This enriched DNA has been amplified by PCR with high fidelity Taq polymease. The amplification products served to construct GsFLX libraries that were sequenced according to Gs-FLX protocol. We obtained 148,434 contigs, representing 39 Mb of sequence data. We identified 9,317 sequences containing microsatellites motifs. Among them, 308 presented suitable flanking regions for primer design. Forty-eight loci were selected for preliminary PCR screening, which resulted in 15 loci with correct amplification (Table 1).

### Studied populations

The 15 identified loci were used to assess genetic diversity of 359 individuals from 13 populations of *G. cubensis* from Cuba (3 populations), Venezuela (3), Ecuador (2), Guadeloupe (2), Martinique (1), Puerto Rico (1), and Colombia (1; see Table 2 for exact location of sampling sites, dates and sample sizes). Since the type locality of *G. cubensis* in Cuba is unknown, we chosed three populations dispatched on the island: eastern, western, and central locations. To prevent eventual Wahlund effect, all sample were collected on small surfaces (<2 m<sup>2</sup>). Collected individuals were stored in ethanol 80% until molecular analyses.

Considering the difficulties in identifying lymneid snails by means of morpho-anatomic data (see Correa et al. 2011), we confirmed the systematic position of our samples by sequencing the gene internal transcribed spacer 2 (ITS-2) (Bargues et al. 2007; Correa et al. 2011). For this purpose, one or two individuals of each sampling site were chosen at random (Table 2). The DNA of each individual was extracted as described above and used as templates for PCR amplifications. PCR were performed according to protocols described in Correa et al. (2011), with primers Forward

News (5' TGTGTCGATGAAGAACGCAG 3') and Reverse Rixo 2 (5' TTCTATGCTTAAATTCAAGGGG 3'). The obtained sequences were compared to sequences of small lymneids truncatula-like sensu (Correa et al. 2011) already published in Genbank. Alignments were performed with webPRANK software (Löytynoja and Goldman 2010). Due to problem of amount of DNA extract, sequencing ITS-2 was impossible for individuals of the following sites: El Progreso (Colombia), Bahia Honda (Cuba), Fond Barboteaux (Guadeloupe), Raune (Martinique) and Mesa de Esnujaque (Venezuela).

### **DNA extraction, amplification of microsatellite loci and genotyping**

Each individual was dissected and the distal part of its foot was removed to be used for DNA extraction. Extraction was performed following the protocol described by Estoup and Martin (1996), modified for 96 well plates. The portion of foot snail was added in 100 µL of Chelex®100 5% (Bio-Rad), with 5 µL of proteinase K (Promega) and then incubated overnight at 56°C. After a final incubation 10 min at 95°C, the mixture was centrifuged (6000 g) during 6 min. The supernatant was then collected and stored at –20°C until further molecular analyses.

Each microsatellite locus was amplified from 2 µL of DNA in a 20 µL reaction volume containing 5 µL buffer 15X (Promega), 1.2 µL MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega), 2.4 µL dNTPs 2.5 mM (Life Technologies), 10 pmol of each primer, and 1 µL of Taq DNA polymerase (Promega). Thermocycling was performed using a MJ-Research PTC 100 96-well. It consisted of an initial denaturation at 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 30 sec, 55°C (annealing temperature) for 30 sec, 72 °C for one min, and a final elongation step at 72 °C for 10 min. Primers were fluorescently labeled (Table 1) to be used in an automated sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA). Amplified products were diluted 1/200 and mixed with 15 µL of Hi-Di Formamide and 0.27 µL of internal size standards (GENESCAN 500 LIZ, Applera). Allele sizes were estimated using GeneMapper® v. 4.0 software (Applied Biosystems™).

### **Population genetics**

Individual genotypes served to estimate current parameters of population genetics: number of alleles, observed and expected heterozygosities and F<sub>IS</sub>. F<sub>IS</sub> values served to estimate selfing rate ( $s = 2F_{IS}/(1+F_{IS})$ ) (Hartl and Clark 1997). Pairwise differentiation among samples (F<sub>ST</sub>) was also estimated. All calculations were made with FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 2001). In the case of multiple tests, Bonferroni corrections were applied.

## Cross amplification tests

We tested amplification of the 15 isolated microsatellite loci of *G. cubensis* in three closely related species (Correa et al. 2010; Correa et al. 2011): *Galba truncatula*, *Galba viator*, and *Galba neotropica* (Bargues et al. 2007). For this purpose, we tested three individuals of *G. truncatula* from Moquegua, Peru (S 17°19'24.3" W 70°59'29"), three individuals of *G. viator* from the type locality of the species, Rio Negro, Argentina (S 40°44'07" W 66°37'27"), and two individuals of *G. neotropica* from Rio Lurin (Peru) a locality where this species has been described by Bargues et al (2007). Again, the species identification was confirmed by the analysis of ITS-2 sequences, as described above.

## Results

### Species identification

All the ITS-2 sequences blasted with the sequence AM412223 of *G. cubensis* with 99% of homology (Bargues et al. 2007), except for the individuals from Moquegua, Rio Lurin, and Ocoña (Peru) that blasted with the sequence AM412225 of *G. neotropica* with 99% of homology and individuals from La Linda and Fincas 4M Tucacas (Venezuela) that blasted with the sequence FR832611 of *G. neotropica* with 99% of homology (Bargues et al. 2011; Fig. 1).

### Diversity at microsatellite loci

Among the 15 loci tested in the 359 individuals of *G. cubensis*, 14 presented polymorphism, whereas Gcu\_1 harbored a single allele (Table 3). The number of alleles per locus ranged from 1 to 10 (mean:  $4.33 \pm 0.67$  SD; Table 3).

### Cross amplifications

On the 15 tested loci, we obtained correct amplification at seven loci for samples of *G. truncatula* and at six loci for *G. viator*. Polymorphism was detected in one locus for *G. truncatula* and in five loci for *G. viator* (Table 3).

Surprisingly, amplification was successful at all loci for *G. neotropica*, with alleles in the range of those already found in *G. cubensis*. Taking into account these results, we added to our analyses 124 individuals of *G. neotropica*. These snails came from two sites in Venezuela, both described as localities of *G. neotropica* by Bargues et al. (2011) and three sites (including Rio Lurin) in Peru (Table 4). Identification as *G. neotropica* was confirmed by sequencing ITS-2 of one or two individuals taken at random in each site, according to protocols described in methods section (Fig. 1).

## **Genetic diversity**

Population genetics parameters per sampling site are given in Table 5. In the 13 populations of *G. cubensis* as well as in the five populations of *G. neotropica*, the allelic diversity was low (mean number of alleles:  $6,33 \pm 0,77$  SD). A total lack of diversity was observed in the Colombian site as well as in the two Ecuadorian sites, in Martinique, Puerto Rico and in Pinadière (Guadeloupe). Observed and expected heterozygosities were very low (mean  $H_o: 0.001 \pm 0.001$  SD; mean  $H_s: 0.066 \pm 0.008$  SD). Excepted in Fond Barboteaux (Guadeloupe), where observed and expected heterozygosities were equal, we observed strong departures from Hardy-Weinberg equilibrium ( $F_{IS} = 0.982 \pm 0.066$  SD; Table 5). Estimated selfing rates were therefore very high (> 89%, excepted Fond Barboteaux).

## **Differentiation among populations**

We observed an important differentiation among populations:  $Fst = 0.88$  ( $p= 0.001$ ). All pairwise  $Fst$  values were high and significant (all  $FST$  values  $> 0.48$  and  $p < 0.05$ ) except for three pairs of populations: Raune (Martinique) and Fond Barboteaux (Guadeloupe) ( $Fst = 0.009$ , NS), Yaguachi and Las dos Puertas (Ecuador) ( $FST = 0$ , NS) and Moquegua and Rio Lurin (Peru) ( $FST = 0.067$ , NS).

## **Discussion**

### **Species differentiation in the group of small *Galba***

Correa et al. (2010) have shown that *G. cubensis* belongs to the clade of « truncatula-like » lymneids. In *G. truncatula*, we obtained amplifications only in seven of the 15 loci and alleles were different from those characterized in *G. cubensis*. Similarly, only six loci were amplified in *G. viator*. These successful cross-amplifications are consistent with the relatedness between *G. truncatula*, *G. cubensis* and *G. viator*, all belonging to the « truncatula-like » group of small lymneids (Correa 2010; Correa et al. 2011). It worth mentioning that five of the six amplified loci in *G. viator* are polymorphic and might be used to assess genetic variability in this species.

On the contrary, amplification was successful for the 15 loci in all the 124 individuals of *G. neotropica* tested. On the 95 alleles detected on both *G. cubensis* and *G. neotropica*, 28 (29,5%) were common to the two. Although homoplasy cannot be excluded, the cross amplification in all loci and the similarity in allele sizes are in favor of the strong relatedness between *G. cubensis* and *G. neotropica*, *G. viator* being sister of this complex *G. cubensis-neotropica*. This is consistent with phylogeny obtained by Correa et al. (2011) that demonstrated that *G. cubensis* and *G. neotropica* are very closely related. Taking into account the similarity between *G. cubensis* and *G. neotropica* in conserved markers (ITS-1, ITS-2, 18S, COI; Correa et al. 2010; Correa et al. 2011), as well as in

microsatellite markers, we can wonder if these two taxa can be longer considered as distinct species or as belonging to the same entity.

### **Characteristics of populations**

In all studied populations, we observed low levels of allelic diversity and small observed and expected heterozygosities. Such low levels of genetic diversity are consistent with those observed in other lymneid snails as *G. truncatula* (Trouvé et al. 2000; Meunier et al. 2001; Meunier et al. 2004; Hurtrez-Boussès et al. 2010), *Galba schirazensis* (Correa 2010), *Omphiscola glabra* (Hurtrez-Boussès et al. 2005) and *Pseudosuccinea columella* (Nicot et al. 2008; Correa 2010). The total lack of diversity in six studied sites may be explained by a recent introduction, leading to a founder effect, as previously shown for populations of *G. truncatula* in the Bolivian Altiplano (Meunier et al. 2001). On the opposite, the highest allelic diversity occurred in a Cuban population (Trinidad: 2.6), suggesting a more ancient presence of *G. cubensis* in this site. This is in agreement with first description of *G. cubensis* in the Cuban island by Pfeiffer in 1839 (Pfeiffer 1839).

Excepted in one population (Fond Barboteaux), departures from Hardy-Weinberg equilibrium are high in all the studied populations of *G. cubensis* and *G. neotropica*. Since sampling on very small areas allows excluding Walhund effect, the observed heterozygote deficiencies are most probably due to high selfing rates in these hermaphroditic snails. These results are similar to those obtained in the closely related *G. truncatula*, in which strong heterozygote deficiencies were also observed (Meunier et al. 2004; Hurtrez-Boussès et al. 2010). Indeed Meunier et al. (2004) experimentally demonstrated that selfing prevails in this species. Since selfing reduces the population effective size ( $N_e$ ) by a factor  $(1 + F_{is})$ , we would expect important genetic drift which leads to a strong decrease in genetic variability.

## Differentiation between populations

As previously shown in *G. truncatula*, our results revealed high levels of total differentiation among populations ( $F_{ST} = 0.88$ ), as well as among populations of *G. cubensis* ( $F_{ST} = 0.87$ ,  $p = 0.001$ ) or among populations of *G. neotropica* ( $F_{ST} = 0.82$ ,  $p = 0.001$ ). This differentiation among sampling sites might be explained by prevailing effects of genetic drift in population biology of these snails. Indeed, these lymneids inhabit in temporary habitats, experiencing drought periods that affect their survival and create strong bottleneck events. A single individual can do re-colonization or colonization of new habitats since selfing is the major reproductive mode.

The lack of differentiation between three pairs of populations (Raune (Martinique)-Fond Barboteaux (Guadeloupe); Yaguachi-Las dos Puertas (Ecuador); Moquegua-Rio Lurin (Peru)) might be explained by a recent introduction events from a single source. The case is particularly striking in Ecuador, where the 88 studied individuals from the two sites exhibited exactly the same multilocus genotype. Such recent colonization events have to be considered with the utmost attention, since *G. cubensis* and *G. neotropica* are potential vectors of fasciolosis. Their spread can therefore favor the expansion of this disease. A comprehensive view of diversity of these lymneid snails and a good knowledge of their phylogeography, combined with parasitological surveys of the different populations are therefore required to better understand the risks of fasciolosis in South America. The use at large scale of the microsatellite markers developed here and their combination with conserved markers can help to solve these questions.

## References

- Alba A, Vázquez A, Hernández H, et al (2015) A multiplex PCR for the detection of *Fasciola hepatica* in the intermediate snail host *Galba cubensis*. *Vet Parasitol* 211(3-4):195–200.
- Bargues MD, Artigas P, Mera y Sierra RL, et al (2007) Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Ann Trop Med Parasitol* 101:621–641. doi: 10.1179/136485907X229077
- Bargues MD, González LC, Artigas P, Mas-Coma S (2011) A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. *Parasit Vectors* 4:200. doi: 10.1186/1756-3305-4-200
- Brown D (1994) Freshwater snails of Africa and their medical importance, 2nd editio. Taylor and Francis Ltd, London, U.K
- Burch J (1982) North American freshwater snails. *Trans Poet Soc* 1:217–365.
- Correa AC (2010) Analyse de l’interaction hôte-parasite sous différentes approches évolutives : le système Lymnaeidae (Gastropoda)–Fasciolidae (Trematoda). Université de Montpellier II
- Correa AC, Escobar JS, Durand P, et al (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evol Biol* 10:381. doi: 10.1186/1471-2148-10-381
- Correa AC, Escobar JS, Noya O, et al (2011) Characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. *Infec* 11:1978–1988. doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.003
- Cotruvo JA, Dufour A, Rees G, et al (2004) Waterborne zoonoses: Identification, causes, and control.
- Dalton J (1999) Fasciolosis. CABI Publishing, Oxon
- Dawes B (1968) The Trematoda with special reference to British and other European forms, 2nd edn. Cambridge University Press, London
- Estoup A, Martin O (1996) Marqueurs microsatellites: isolement à l'aide de sondes non-radioactives, caractérisation et mise au point.
- Franco-Paredes C, Santos-Preciado JI (2015) Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean.

- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Updated from Goudet (1995).
- Graczyk T, Fried B (1998) Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. *Am J Trop Med Hyg* 58:501–504.
- Gutiérrez A, Perera G, Yong M, et al (2000) Life-history Traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under Experimental Exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:747–752.
- Hartl D, Clark A (1997) Principles of Population Genetics. Sinauer Associates Inc., U.S.
- Horák J, Kolárová, L (2001) Bird schistosomes: do they die in mammalian skin? *Trends Parasitol* 17:66–69.
- Hubendick B (1951) Recent Lymnaeidae, their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. *K Sven Vetenskapsakademiens Handl* 3:1–223.
- Hurtrez-Boussès S, Hurtrez J-E, Turpin H, et al (2010) Hydrographic network structure and population genetic differentiation in a vector of fasciolosis, *Galba truncatula*. *Infect Genet Evol* 10:178–83. doi: 10.1016/j.meegid.2010.01.005
- Hurtrez-boussès S, Meunier C, Durand P, Renaud F (2001) Dynamics of host – parasite interactions : the example of population biology of the liver fluke ( *Fasciola hepatica* ). *Microbes Infect* 3:841–849.
- Hurtrez-Boussès S, Pendino A, Barnabé C, et al (2005) Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Can J Zool* 83:1643–1648.
- Löytynoja A, Goldman N (2010) webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. *BMC Bioinformatics* 11:579. doi: 10.1186/1471-2105-11-579
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero M a. (2005) Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol* 35:1255–1278. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.010
- Meunier C, Hurtrez-Boussès S, Jabbour-Zahab R, et al (2004) Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity (Edinb)* 92:316–322. doi: 10.1038/sj.hdy.6800410
- Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S, et al (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Mol Ecol* 10:1333–1340.

Nicot A, Dubois M, Debain C, et al (2008) Characterization of 15 microsatellite loci in the pulmonate snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca, Gastropoda). Mol Ecol Resour 8:1281–1284.

Pfeiffer L (1839) Bericht über die Ergebnisse meiner Reise nach Cuba im Winter 1838-1839. Arch für Naturgeschichte 5:346–359.

Sanabria R, Mouzet R, Courtiou B, et al (2012) Intermediate snail hosts of French *Fasciola hepatica*: *Lymnaea neotropica* and *Lymnaea viatrix* are better hosts than local *Galba truncatula*. Parasitol Res 111:2011–2016. doi: 10.1007/s00436-012-3049-9

Trouvé S, Degen L, Meunier C, et al (2000) Microsatellites in the hermaphroditic snail, *Lymnaea truncatula*, intermediate host of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Mol Ecol 9:1661–1686.

Trouvé S, Degen L, Renaud F, Goudet J (2003) Evolutionary implications of a high selfing rate in the freshwater snail *Lymnaea truncatula*. Evolution (N Y) 57:2303–2314.

Van Dijk J, Sargison ND, Kenyon F, Skuce PJ (2008) Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. In: International Conference Livestock and Global Climate Change. Hammamet, Tunisia,

Vázquez AA, Sánchez J, Pointier J-P, et al (2014) *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. J Helminthol 88:434–440.

**Table 1.** Characteristics of microsatellite loci isolated in *G. cubensis*. F means forward primer and R means reverse primer.

Locus	Accession number to Genbank	Primer sequence (5'-3')	Dye label used for forward primers	Repeat motif	Size of the amplification product (bp)	Annealing temperature (°C)
Gcu_1	KT285812	F: TATATGGAAAAGCAGGCC R: AAGAGCATTAAGACTTGCTTAGACTAT	ATTO 550	AC	231	55
Gcu_5	KT285813	F: GCATTTCATCTTCTGAECTCCC R: CAACAACCACACTCACTTCAA	ATTO 565	TG	291	55
Gcu_13	KT285814	F: GTCTGTCACACAGTTCATATTCTCA R: CAACGAATATTGAAATGGCCT	ATTO 565	CA	192	55
Gcu_19	KT285815	F: ACAGAAAAGTCAGTGAGAAAAAGACTG R: TCAGTTTGACCTGCACCCCT	ATTO 550	AG	140	55
Gcu_21	KT285816	F: CGGACATTTCTATGTGCTCG R: CACAGCAATTCACTAATTAAAGACA	ATTO 565	AAC	119	55
Gcu_27	KT285819	F: TTTCCCTTGGAACCATGT R: AGATATGACGTCAGTGTGACAGA	FAM	TC	127	55
Gcu_30	KT285820	F: AGAGGCAAGGGAGAAAGGAG R: CTCAATCACTCTCAAACCTCACTCA	ATTO 550	AGTG	131	55
Gcu_31	KT285821	F: CTTGTGGCTCAGTGTGTTGA R: GGCTGCAAGATGTGTTGAGA	HEX	TG	131	55
Gcu_34	KT285822	F: AAAAGACTTTAACCTTACCCACCC R: GTCACTACTGCTTGTCTCAGCA	HEX	AC	190	55
Gcu_35		F: GTCAGTGTGACAGATACCAACGAA R: CCAAGAGCTTGCTACAGACA	FAM	AG	113	55
Gcu_37	KT285823	F: GATTGAGCTGAGGCAGAG R: TTGTGCTATGTCTCTAAAGGTAGTGA	HEX	GA	240	55
Gcu_39	KT285824	F: GTTTGTCTTGATTACCTGATTCTTT R: ACCTTCAGGTGTATTGATTGAAA	ATTO 550	TG	116	55
Gcu_40	KT285825	F: AGGATACGGCGATTGAA R: TTATCACAAGTCATCATGAATCAA	ATTO 565	AC	136	55
Gcu_41	KT285826	F: ACCGACCTATAAACAAACAGAAGA R: TGGCAAACTCCATATTACA	HEX	AG	118	55
Gcu_44	KT285827	F: CAACTTGGGACATGTTGGA R: TGGACCTTGTGTTATCTTGG	FAM	AC	194	55

**Table 2.** Sampling sites of *Galba cubensis*.

Site	Country	GPS coordinates	Date of sampling	Sample size (N)
El progreso	Colombia	N 06°12' 01" W 75° 35' 06"	07/08/09	48
Bahia Honda	Cuba	N 22° 54' 9.4 W 83° 10' 15.9"	26/02/03	23
Contramaestre	Cuba	N 20° 30' 08" W 76° 26' 40"	19/02/03	17
Trinidad (Rio el Junco)	Cuba	N 21° 43' 57" W 79° 33' 23"	15/05/02	32
Las dos Puertas	Ecuador	S 1° 56'1.1" W 79° 34' 38.1"	16/10/14	44
Yaguachi	Ecuador	S 2° 5' 34.4" W 79° 42' 29.8"	15/10/14	44
Fond Barboteaux	Guadeloupe (France)	N 16° 10' 04" W 61° 39' 11"	14/12/03	27
Pinadière	Guadeloupe (France)	N 14° 40' 29" W 60° 56' 26"		21
Raune Mansarde au Robert	Martinique (France)	N 14° 40' 29" W 60° 56' 26"	14/04/11	43
Puerto Rico	Puerto Rico		01/10/98	9
Mato	Venezuela	N 10° 34' 48.2" W 62° 59' 21.6"	21/11/06	10
Mesa de Esnujaque	Venezuela	N 9°2'18.9" W 70° 42' 58.1	19/10/05	31
San Mateo	Venezuela	N 10° 12' 41.4" W 67° 24' 51.8"	26/10/10	10

**Table 3.** Allelic diversity in *Galba cubensis* and *Galba neotropica* and results of cross amplification tests in *Galba truncatula* and *Galba viator*. Total number of alleles and allele size range were estimated from 359 individuals of *G. cubensis*. In brackets are the total number of alleles and allele size range that were estimated from 124 individuals of *G. neotropica*. N cu-ne means number of allele in common between *G. cubensis* and *G. neotropica*. Alleles size was estimated whenever possible for *Galba truncatula* (N=3) and *Galba viator* (N= 3). NA means no amplification.

Locus	Number of alleles	Allele size range (bp)	N cu-ne	Allele size range (bp)	
				<i>G. truncatula</i>	<i>G. viator</i>
Gcu_1	1 (2)	232 (232-282)	1	221	221; 223
Gcu_5	2 (2)	291-293 (291-293)	2	257; 291	NA
Gcu_13	2 (3)	191-193 (193-200)	1	190	NA
Gcu_19	4 (4)	142-150 (144-172)	0	NA	NA
Gcu_21	6 (6)	102-144 (100-128)	3	NA	NA
Gcu_27	3 (4)	125-135 (125-145)	3	NA	NA
Gcu_30	9 (4)	135-173 (144-165)	2	NA	NA
Gcu_31	2 (2)	131-133 (130-133)	1	NA	124
Gcu_34	5 (5)	183-197 (179-200)	2	181	NA
Gcu_35	9 (4)	108-125 (121-127)	3	113	104; 123; 125
Gcu_37	4 (3)	237-243 (237-254)	3	214	229; 237; 241
Gcu_39	3 (4)	118-124 (114-122)	2	104	106; 110
Gcu_40	6 (5)	124-142 (124-182)	1	NA	NA
Gcu_41	7 (4)	108-120 (114-122)	3	NA	NA
Gcu_44	2 (4)	188-190 (180-192)	1	NA	175; 181; 182

**Table 4.** Sampling sites of *Galba neotropica*

Site	Country	GPS coordinates	Date of sampling	Sample size (N)
Moquegua	Peru	S 17° 19' 24,3" W 70° 59' 29"	15/10/2012	42
Ocoña	Peru	S 16° 25' 16.8" W 73° 6' 55.8 "	13/10/2012	12
Rio Lurin	Peru	S 12°6' 7.1 " W 76° 47' 17.3"	07/10/2012	51
La Linda	Venezuela	N 10°5'24.1" W 67°47'25.4"	18/11/2006	9
Fincas 4M Tucacas	Venezuela	N 10° 46' W 68° 24'	19/09/2001	10

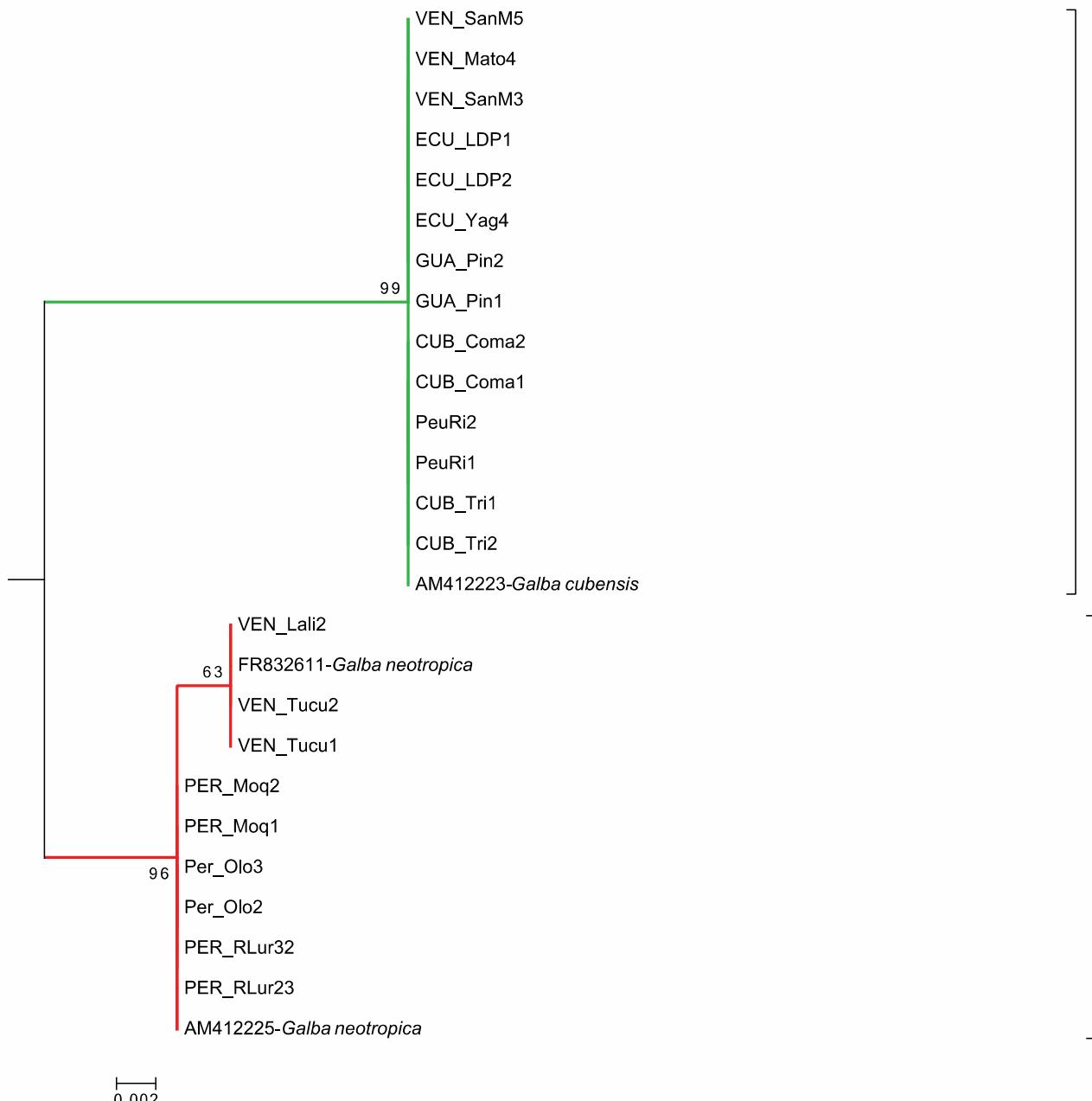
**Table 5.** Population genetic parameters of the 18 studied sites of *Galba cubensis*. NS means non-significant. The 13 first sites correspond to *G. cubensis*, the five last sites to *G. neotropica*.

Site	Mean number of alleles (NA)	Observed heterozygosity (Ho)	Expected heterozygosity (Hs)	F <sub>IS</sub> (p-value after Bonferroni correction)	Estimated selfing rate (s)
El progreso (Colombia)	1	0	0	--	--
Bahia Honda (Cuba)	1.07	0	0.013	1 (0.05)	1
Contramaestre (Cuba)	1.73	0.008	0.117	0.931 (<0.02)	0.964
Trinidad (Cuba)	2.6	0.005	0.455	0.990 (<0.02)	0.995
Las dos Puertas (Ecuador)	1	0	0	--	--
Yaguachi (Ecuador)	1	0	0	--	--
Fond Barboteaux (Guadeloupe, France)	1.07	0.002	0.002	0 (NS)	0
Pinadière (Guadeloupe, France)	1	0	0	--	--
Raune Mansarde au Robert (Martinique, France)	1	0	0	--	--
Puerto Rico	1	0	0	--	0
Mato (Venezuela)	1.27	0	0.086	1 (<0.02)	1
Mesa de Esnujaque (Venezuela)	1.13	0	0.026	1 (<0.02)	1
San Mateo (Venezuela)	1.27	0	0.081	1 (<0.02)	1
Moquegua (Peru)	1.07	0	0.003	1 (NS)	1
Ocoña (Peru)	1.27	0	0.101	1 (<0.02)	1
Rio Lurin (Peru)	1.6	0.007	0.035	0.813 (<0.02)	0.897
La Linda (Venezuela)	1.07	0	0.017	1 (NS)	1
Fincas 4M Tucacas (Venezuela)	1.85	0	0.317	1 (<0.02)	1

## Figure legend

**Figure 1.** Phylogenetic tree of ITS-2 sequences available in GenBank from *Galba cubensis* obtained in this study and in Bargues et al. (2011) and in Bargues et al. (2007). References in the figure indicate the accession number in GenBank and species' name.

**Figure 1.**



*In preparation*

## Ancient versus recent invasion: two genetic signatures in colonization history of a freshwater selfing snail *Galba cubensis-neotropica*

Manon Lounnas<sup>1\*</sup>, Pilar Alda<sup>1,2</sup>, Antonio Vazquez<sup>1,3</sup>, Alfredo Gutiérrez<sup>3</sup>, Mary Yong<sup>3</sup>, Jorge Sánchez<sup>3</sup>, Alberto Orlando Narváez<sup>4</sup>, Jenny Muzzio Aroca<sup>5</sup>, Veronica Macias Castro<sup>6</sup>, Luiggi Martini Robles<sup>7</sup>, Oscar Noya<sup>8</sup>, Cristina Visnivesky-Colli<sup>9</sup>, Lucila Prepelitchi<sup>9</sup>, Rolando Ayaqui<sup>10</sup>, José Arenas<sup>11</sup>, Eric Sam Loker<sup>12</sup>, Patrice David<sup>13</sup>, Philippe Jarne<sup>13</sup>, Jean-Pierre Pointier<sup>14</sup>, Sylvie Hurtrez-Boussès<sup>1,15</sup>

\* Corresponding author: [manon.lounnas@gmail.com](mailto:manon.lounnas@gmail.com)

<sup>1</sup> Institut de Recherche pour le Développement, MIVEGEC, UM – CNRS 5290 – IRD 224 Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Centre IRD, Montpellier, France.

<sup>2</sup> Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CONICET-UNLP), Boulevard 120 s/n e/61 y 62, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI.

<sup>5</sup> Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI, Guayaquil, Ecuador

<sup>6</sup> Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Medicina y Veterinaria y Zootecnia, Guayaquil, Ecuador.

<sup>7</sup> Laboratorio de Parasitología Luiggi Martini y colaboradores, Guayaquil, Ecuador.

<sup>8</sup> Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela y Centro para Estudios sobre Malaria IAES-INH, MPPS, Caracas, Venezuela

<sup>9</sup> Unidad de Ecología de Reservorios y Vectores de Parásitos, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 4 piso, Laboratorio 55, Ciudad Autónoma de Buenos Aires C1428EGA, Argentina

<sup>10</sup> Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú

<sup>11</sup> Facultad de Biología Marina, Universidad Científica del Sur, Perú

<sup>12</sup> Center for Evolutionary and Theoretical Immunology, Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM87131, USA

<sup>13</sup> Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive UMR 5175, 1919 Route de Mende, Campus CNRS, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>14</sup> USR 3278 CNRS–EPHE, CRIODE Université de Perpignan, Perpignan, France.

<sup>15</sup> Département de Biologie–Ecologie, Faculté des Sciences, Université Montpellier 2, Montpellier, France.

Total word count: 5,308 (excluding references, tables, and figures)

Page count: 30 in total

19 text pages (without references)

2 tables

3 figures

1 table and 2 figures in Supplementary material

Running head: Phylogeography of *Galba cubensis-neotropica*

**Key words:** Phylogeography, Neotropic, freshwater snails, *Fasciola hepatica*, fascioliasis, *Galba cubensis*, *Galba neotropica*

## ABSTRACT

The distribution of genetic variability within species depends not only on currently acting forces but also on species history. Phylogeographic patterns, colonization events or biological invasions can leave distinct genetic signatures. Recently established populations harbour population reduced genetic diversity due to founder effect while ancient established populations belong to deeper phylogenetic clades and harbour higher genetic diversity. We focus on the *Galba cubensis-Galba neotropica* group, hermaphroditic freshwater snails and intermediate hosts of *Fasciola hepatica*, the causative agent of fascioliasis in the Neotropics. This group is supposed to take its origin around the Caribbean region (Cuba – South USA) and extended its geographic distribution to South America and more recently to Ecuador. We evaluate the distribution of genetic diversity over its distribution range using 15 nuclear microsatellite markers and rDNA ITS-2 and mtCOI sequences in order to infer its demographic dynamics and colonization history. We showed that there is no clear genetic delimitation between these two species, suggesting that they might be considered as conspecifics. We detected a large selfing rate in most populations with a strong populations structure. The presence of high number of multi locus genotypes (MLG) and haplotypes in North American samples argues for a North American origin. An ancient introduction in Cuba probably occurred from South USA since we found high number of MLG but only one ITS-2 haplotype on this island. Another interesting result is the ancient divergence between Northern and Southern American populations showing few gene flows between the both sides of the Amazon River. Finally newly established populations showed diminished genetic diversity. These results are discussed in the light of (1) phylogeographic patterns at the Neotropic scale, (2) human activities resulting in recurrent introductions and bioinvasions and (3) implications for the expansion of fascioliasis.

## INTRODUCTION

Evolutionary forces at different time scales determine the distribution of genetic variability within species. Ancient biogeographical events generated diversity in particular regions while current phenomena like globalization and human activities (e.g. agriculture, aquaculture or mass tourism) have increased at a global scale species dispersion outside their natural geographic range and influenced species biogeography (Elton 1958; Kolar & Lodge 2001). These processes are studied by phylogeography allowing integration of phylogenetics and population genetics for investigating micro and macroevolutionary phenomena (Avise 2000). Development of phylogeographic studies have helped to elucidate the relative influence of common earth history events on current patterns of biodiversity (Hickerson *et al.* 2010). The study of South American species proved to be particularly interesting to bring out patterns and refugee hypothesis, like the barrier effect of Amazonian rivers or the forest refugees in the Amazon basin during the glaciated period of the Pleistocene (Haffer 1997; Moritz *et al.* 2000; Burney & Brumfield 2009). For instance, Mavárez *et al.* 2002 showed that *Biomphalaria glabrata*, a freshwater snail, is split into Northern and Southern genetic clades, due to the barrier effect of Amazonian river. Colonisation in the south probably occurred after a glaciation. This study invalidated the forest refuges hypothesis for freshwater organisms because equatorial forest of the Amazon Basin does not provide suitable habitats for freshwater organisms (Paraense 1983).

At a microevolutionary scale, the distribution ranges of freshwater organisms have been deeply modified by human activities increasing the establishment and spread of species outside their native range (Roman & Darling 2007; Karatayev *et al.* 2008; Kopp *et al.* 2012; Bousset *et al.* 2014). Human-mediated invasions have the particularity to accelerate invasion process across natural barriers and promote establishment of a population from few individuals and far from the core population. The few introduced individuals have to settle a new population from a reduced genetic pool in the absence of migration from the core population. The generated founder effect, results in a drastic lost of genetic diversity in the newly invasive population. In this context mating system can be a major factor for successful colonization. According to the Baker's law (Baker 1967) a selfer species is expected to have more success than strict outcrossing species because it ensures offspring despite the absence of mating partners. As a corollary of the Baker's law we expect that in hermaphroditic organisms selfing is preferred in the invasion front often associated to successiveness in colonization or invasion.

Here we focus on *Galba cubensis*, the main freshwater snail which plays a major role as intermediate host of the liver fluke (*Fasciola hepatica*) in the New World. *G. cubensis* is widely distributed in the Neotropics and seems currently in expansion in non native areas

(Alda *et al. in prep*). Indeed, originally described from Cuba by Pfeiffer in 1839, the current range of *G. cubensis* extends from the southern part of United States to South America (Pointier 2015). Recently a malacological survey carried out in Ecuador reported for the first time the presence of ten populations of *G. cubensis* in rice fields from the Guayas Province (Alda *et al. in prep*). This argues in favour of a relatively recent introduction of *G. cubensis* in Ecuador. Moreover *G. cubensis* is hermaphrodite but is known for doing preferentially inbreeding (Lounnas *et al. in prep*). Therefore its colonisation could be associated with a drastic loss of genetic diversity. Knowing its high susceptibility to *F. hepatica* it could represent an epidemiological threat. Better understand its colonization history is crucial to understand and prevent fascioliasis expansion in South America. Besides, *G. cubensis* is a good model to test natural range expansion and human activities on phylogeographic patterns in the Neotropics.

Nothing is known neither the genetic diversity across the distribution range nor about the geographic origin of this species. However according to field observation the supposed origin area could be the Caribbean region around South USA and Cuba. Moreover a genetic closed taxa, *Galba neotropica* was described recently from Peru (Rio Rimac) few years ago (Bargues *et al.* 2007) and was since reported in Argentina (Standley *et al.* 2013) and Venezuela (Bargues *et al.* 2012). A barcoding analysis carried out on this group of small-shelled lymnaeids showed that these two species might be considered as conspecifics (Correa *et al.* 2011). More recently, Lounnas *et al.* (*in prep*) showed that the 15 microsatellite markers they developed specifically on *G. cubensis* also worked on *G. neotropica*. Consequently these two latter taxa sharing the same evolutionary history will be studied together here as a single group: *Galba cubensis-neotropica*. In this study, we will test if the two species correspond to two related but distinct phylogenetic clades or if their distinction is not phylogenetically supported.

We here examine the genetic diversity of the group *Galba cubensis-neotropica* across its distribution range. This is the largest genetic study to date in terms of coverage of these species ranges. We used 15 nuclear microsatellites, ITS2 rDNA and COI mitochondrial marker on 52 populations collected over the last 20 years in the Neotropic region. Highly polymorphic markers describe demographic history at a recent time scale while more conserved markers (ITS2 and COI) elucidate the phylogeographic relationships among American populations since they are expected to reflect ancient divergence events.

Our sampling allowed (1) to test the validity of the two species *G. cubensis* and *G. neotropica* and (2) to study the genetic diversity across the colonization history of *G. cubensis*, reflecting recent and ancient colonization events.

## MATERIALS AND METHODS

### **Sampling**

*Galba cubensis* and *Galba neotropica* belong to the cryptic small shelled Lymnaeidae group (Correa *et al.* 2011), in which morpho-anatomic parameters can lead to confusion with related species, namely *G. truncatula*, *G. schirazensis* and *G. viatrix*. Alda, Lounnas *et al.* (in prep) published a new method, based on specific microsatellite markers, to ascertain the species identification. Applied here this method confirmed that all the sampled snails belonged to the *G. cubensis-neotropica* group. 32 sampled populations are published in Alda, Lounnas *et al.* (in prep) and are indicated in table S1.

We sampled a total of 907 individuals of *G. cubensis-neotropica* at 52 sites (5 to 52 individuals per site) located in different countries across the neotropic region (Fig. 1) and from diverse freshwater environments (brooks, rivers, lakes, ponds, ditches, canals and irrigation systems). All populations were sampled between 1996 and 2014 (Table S1). Snails were hand collected and immediately stored in 80% ethanol for further molecular analysis.

### **DNA extraction**

For each individual, DNA was extracted from the distal part of the foot. Extractions were performed using 200 µl of 5% Chelex® (Chelex Bio Rad diluted in a Tris-EDTA buffer) solution incorporating 5 µl of proteinase K (Sigma) at a concentration of 20 mg/ml. This suspension was heated at 56 °C for 6 h followed by gentle vortexing and a further incubation at 95 °C for 10 min. The mixture was gently vortexed and centrifuged at 10000 g for 10 sec. The supernatant (100 µl) was taken, diluted 1:10 in deionized water and stored at -20 °C.

### **Microsatellite markers**

#### *Amplification and genotyping*

Each individual was genotyped at 15 nuclear microsatellite loci, according to protocols described in Lounnas *et al.* (in prep): Gcu01 (GenBank accession number: KT285812), Gcu05 (KT285813), Gcu13 (KT285814), Gcu19 (KT285815), Gcu21 (KT285816), Gcu27 (KT285819), Gcu30 (KT285820), Gcu31 (KT285821), Gcu34 (KT285822), Gcu35 (NA), Gcu37(KT285823), Gcu39 (KT285824), Gcu40 (KT285825), Gcu41 (KT285826) and Gcu44 (KT285827).

We used MICRO-CHECKER 2.2.3. (Van Oosterhout *et al.* 2004) to estimate stutter errors and the proportion of null alleles for the 52 samples.

### *Genetic diversity and population differentiation*

For each individual, a multilocus genotype (MLG, here the unique combination of 30 alleles for the 15 microsatellite loci) was assigned using GENCLONE (Arnaud- Haond & Belkhir 2006).

The genetic polymorphism of each population was determined using standard parameters, including the number of polymorphic loci, observed ( $H_o$ ) and expected heterozygosities ( $H_e$ ) (Nei 1973; Nei 1977). These parameters were estimated using GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen 2004). Allelic richness was estimated with FSTAT v2.9.4. (Goudet 2003) after a rarefaction to  $N = 4$  individuals, based on the minimum sample size without missing data.

In addition, deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested for each population using Wright's F-statistics (Wright 1965) which were estimated at two spatial scales: within populations ( $F_{is}$ ) and among populations ( $F_{st}$ ).  $F_{is}$  and  $F_{st}$  were estimated using Weir & Cockerham (1984) unbiased estimators ( $f$  and  $\theta$  respectively), computed with GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen 2004). Deviations from HWE were tested using randomization procedures: 10,000 permutations of alleles among individuals in each population ( $F_{is}$ ) and among populations ( $F_{st}$ ) on the software FSTAT v2.9.4 (Goudet 2003). 95% confidence intervals were obtained by bootstrapping over loci.

In addition, we estimated the average selfing rate of each population as  $s = 2F_{is}/(1+F_{is})$  (Hartl & Clark 1997), as well as with a method based on the distribution of multilocus heterozygosity implemented in RMES software (David *et al.* 2007). Isolation by distance was tested using the Mantel test implemented in the Isolation by Distance Web Service (Jensen *et al.* 2005). We used the shortest arc-distance on the Earth's surface between two sites as the geographic distance and the logarithm of  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  as the genetic distance (Rousset 1997).

### *Bayesian cluster analysis and microsatellite network*

To gain deeper insight into the genetic structure of populations and obtain a more synthetic view of the organization of the molecular variation, we performed three complementary analyses. First, we used a Bayesian clustering method to determine the probability that each individual genotype occurs in a given cluster using InStruct (Gao *et al.* 2007). We preferred InStruct to Structure (Pritchard *et al.* 2000) because *G. cubensis* is a preferential selfer, thus HWE assumption in populations is violated (Lounnas *et al.* in prep.). Second, we carried out a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC), implemented in the adegenet package (Jombart *et al.* 2010). This analysis allows identifying clusters of genetically related individuals by taking into account the population information.

One of the main advantages of DAPC is that it does not rely on a particular population genetic model, and is thus free of assumptions about Hardy-Weinberg equilibrium or linkage disequilibrium. The number of putative populations was first described by a k-mean clustering approach for k=1 to k=52. Clustering with the lowest value for the Bayesian information criterion (BIC) is regarded to provide the best fit. Here the BIC distribution does not show a particular lowest value but suggests that 10-20 clusters would provide relevant summaries of the data set. We selected k=16 for DAPC analysis because we obtained k=16 with InStruct analysis and because assignment individuals matrix for both analysis were consistent. Relationships between the 16 clusters were then inferred using DAPC. Seven principal components were retained as inferred by the  $\alpha$ -score. The  $\alpha$ -score gives a number of principal components optimized in order to capture the best discrimination without overfitting.

Third, we reconstructed a neighbour-joining (NJ) network using the software SplitsTree4 (Huson & Bryant 2006), based on a genetic distance matrix between populations, using the Nei (1972, 1978)'s genetic distance implemented in the software Genetix (Belkhir *et al.* 1998).

Finally, the allelic richness and expected heterozygosities were compared between genetic groups inferred by structuring analyses. Multiple comparisons were done using ANOVA (gene diversities were arcsine-square-root transformed) followed by Tukey post-hoc tests.

### ***COI and ITS2 sequencing and analysis***

#### *Amplification and sequencing*

We used a set of 41 sequences for the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) and 27 sequences for the cytochrome C oxydase subunit 1 (CO1) published in Alda, Lounnas *et al.* (In prep) for populations previously identified in this study as indicated in Table S1. We added 15 sequences for ITS2 and three sequences for COI using the primers published in (Folmer *et al.* 1994). PCR amplification for each pair of primers was performed in a total volume of 25  $\mu$ l containing 12.5  $\mu$ l of Taq PCR Master Mix (Qiagen), 2.5  $\mu$ l of each primer, and 2  $\mu$ l of DNA in an Eppendorf Thermal Cycler with an initial denaturation step at 95 °C for 15 min, followed by 35 denaturation cycles at 95 °C for 30 sec, annealing at 50 °C for one min, extension at 72 °C for one minute and a final extension at 60 °C for 10 min. The amplification products were electrophoretically checked in a 1% agarose gel and stained with EZ-Vision. DNA sequencing was performed by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) using PCR-amplified products as templates. After combining sequences from Alda, Lounnas *et al.* (in prep) and sequences obtained in this study, we had 52 sequences for ITS-2 covering the majority of sampling range, but only 30 sequences for COI due to technical

issues. In addition, we downloaded three ITS2 and COI sequences from Genbank (Bargues *et al.* 2007; Correa *et al.* 2011) for phylogenetic analyses (see Table S2 for exact locations and Genbank accession numbers)

#### *Haplotype variability, sequence alignment and phylogenetic analysis*

The number of haplotypes (Nh), the haplotype diversity (H) and the nucleotide diversity ( $\pi_n$ ) per haplotype were calculated using DnaSp V5 (Librado & Rozas 2009).

ITS2 and COI sequences were aligned using webPRANK (Löytynoja & Goldman 2010). For each method of tree reconstruction we performed separated analyses for the two genes. Two approaches of phylogenetic tree reconstruction, Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI), were used. ML analyses were conducted using the best-fitting model of sequence evolution. Model selection was based on Akaike's information criterion (AIC) using Mega6 (Tamura *et al.* 2013). The program ran 5000 bootstrap replications (Table S3). BI analyses were performed with MrBayes software v3.2 (Ronquist *et al.* 2011). The tree space was explored using Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analyses with random starting trees and four simultaneous, sequentially heated independent chains sampled every 500 trees during five million generations. Suboptimal trees were discarded once the "burn-in" phase was identified and a majority-rule consensus tree, with posterior probability support of nodes (PP), was constructed with the remaining trees.

## RESULTS

### *Within population microsatellite diversity*

The number of polymorphic loci found per population ranged from 0 to 15 (Table 1). Populations with seven or more polymorphic loci were four populations from Cuba (Bat, Padi, Tri and V126), four populations from North America (Char, Lowo, Sull and Tepe) and one population from Venezuela (Tucu).

The number of alleles per locus varied from nine to 24 (mean  $\pm$  SE:  $13.529 \pm 3.891$ ) over all populations. The average gene diversity (He) was  $0.091 \pm 0.149$  (SD) and the observed heterozygosity (Ho) was  $0.017 \pm 0.065$  (SD) (Table 1). Most genotyped individuals proved to be homozygous at the 15 microsatellite loci (851 individuals, 93.8%). Consequently, the estimated selfing rate overall populations was high ( $0.893 \pm 0.234$  SD; Table 1). However two populations from USA (Lowo and Tepe) harboured higher  $F_{IS}$  values (0.566 and 0.451 respectively) and therefore lower estimated selfing rates (0.538 and 0.339). A total of 161 multilocus genotypes was found with a mean of 3.269 per population ( $\pm 2.708$  SD).

Higher allelic richness and gene diversity were detected in the USA and Cuban populations than in all other groups of populations ( $P < 0.004$ ).

Exact tests for linkage disequilibrium between microsatellite loci overall populations gave 61 significant Bonferroni corrected P-values at the 1% level out of 136 pairs of loci. Significant linkage disequilibrium were approximately uniformly distributed across populations except in the four Cuban populations and seven North American populations where most pairs of loci were not in linkage disequilibrium.

### **Structure analysis and microsatellite network**

The genetic differentiation among populations was strong and highly significant ( $F_{st} = 0.849 \pm 0.111$  SE). Isolation by distance was not detected at the whole study scale ( $P = 0.314$ ). At a local scale significant isolation by distance was detected only in Cuba ( $R^2=0.048$   $P < 0.001$ ).

Analysis of genetic structure of *G. cubensis* using DAPC, Bayesian clustering and NJ distance network, returned largely consistent results. DAPC suggested the existence of  $10 < k < 20$  genetically distinct clusters and InStruct of 16 clusters (individual cluster assignment probability matrix available upon request). Individual cluster assignment probability matrix for  $k=16$  gave similar results for DAPC and InStruct. We therefore retained  $K=16$  from these two analyses. According the NJ distance Network (Fig. S1) and the DAPC analyses (Fig. 2) the 16 genetic clusters can be structured in four groups mentioned as A, B, C, and D in both figures (Fig. 2 and S1). We recovered the following groups in the DAPC analysis (Fig. 2) and the genetic distance network (Fig. S1): (A) all populations from Argentina, Peru and Uruguay, (B) Venezuela and French Caribbean Islands, four Venezuelan populations in a sub-group (Cali, Mato, Mesa and SanM) in a sub-group, (C) two populations from USA (Lowo and Tepe) in a sub-group, three other populations from USA, Puerto Rico and some populations from Cuba, and (D) six populations from Cuba, all populations from Ecuador, Colombia, and one population from USA (Lola). In most cases, individuals from the same population clustered in the same genetic group except for one Cuban population (Tri) for which individuals were assigned to the groups C and D, one population from Venezuela (Tucu) and one from USA (Lowo) with individuals assigned in groups B and C.

Higher allelic richness and gene diversity were detected in the group C (USA/CUB/PUERI) compared to all other groups of populations ( $P < 0.0007$ ). Groups A (ARG/PER/UR), B (VEN/GUA/MAR) and D (ECU/COL/CUB/USA) did not show significant differences ( $P > 0.99$ ).

## **Phylogenetic analyses and haplotype diversity**

### *Haplotype diversity*

The analysis of rDNA ITS2 sequences revealed seven haplotypes (mean gene diversity per haplotype:  $H_d = 0.588 \pm 0.060$  SD) determined by 24 polymorphic sites without indels (nucleotide diversity:  $\pi = 0.0172 \pm 0.002$ ; Table 3). At the COI gene nine haplotypes ( $H_d = 0.857 \pm 0.033$  SD) were detected, determined by 26 polymorphic sites without indels ( $\pi = 0.0166 \pm 0.020$ ; Table 3). For both markers, North American populations had the highest number of haplotypes ( $N_h = 4$ , average per haplotype:  $H = 0.933 \pm 0.122$  SD for ITS2;  $N = 4$ , mean:  $H_d = 0.786 \pm 0.113$  SD for COI) followed by Venezuela ( $N_h = 2$  for ITS2;  $N_h = 2$  for COI). A unique haplotype was detected in populations from Cuba, Caribbean Islands, Peru and Argentina for ITS2 and a single mitochondrial haplotype was detected in populations from Guadeloupe, Ecuador and Peru.

### *Phylogenetic analysis: population structure and phylogeography*

The best model describing the evolution of the rDNA ITS2 and COI was TN92 and HKY + G respectively. The ML and BI majority rule consensus trees resulted in similar tree topology with high branch supports for almost all nodes (Fig. 3).

In the ITS2 tree, the most external clade is composed by sequences from Argentina and Peru and a sequence retrieved from Genbank identified as *G. neotropica* (haplotype A) and by a sub-clade grouping sequences from Venezuela and another sequence retrieved from Genbank identified as *G. neotropica* (haplotype B). Then there are three distinct North American branches (haplotypes C, D and E) and a terminal clade grouping all other populations from Venezuela, Cuba, Puerto Rico, Guadeloupe and Ecuador and a sequence retrieved from Genbank identified as *G. cubensis* (haplotypes F and G ; Fig. 3 and S2).

In the COI tree, sequences group in five major clades with high bootstrap value and posterior probabilities (88 to 100%). The most external clades are one grouping two North American populations (haplotypes A and B), followed by a clade composed by sequences from Argentina, Peru, Uruguay and two sequences retrieved from Genbank identified as *Galba neotropica* from Peru and Argentina (haplotypes C and D). We then find, a clade grouping sequences from Venezuela and a sequence identified as *G. neotropica* from Venezuela (haplotype E). A last group of less divergent clades includes (1) sequences from Venezuela (haplotype F), a sequence from USA-Flor (haplotype G), Guadeloupe (haplotype H) and a sequence identified as *G. cubensis* and (2) a terminal clade composed by Colombia, Ecuador and USA (haplotype I; Fig. 3 and S2).

Interestingly Venezuelan sequences which grouped with a *G. neotropica* sequences in the COI tree, grouped with the *G. cubensis* sequence in the ITS-2 tree (Fig. 3)

## DISCUSSION

### **“*Galba cubensis*” and “*Galba neotropica*”: two entities for a same species**

Our phylogenetic results showed that mismatch occurred for *G. cubensis* and *G. neotropica* between ITS-2 rDNA and COI mitochondrial. Individuals from Argentina and Peru grouped in a “neotropica” clade for both genes and individuals from Ecuador, Colombia and Caribbean islands grouped in a “cubensis” clade. However this dichotomy is less clear for North American and Venezuelan populations since some individuals identified as *G. cubensis* for the ITS-2 sequence are identified as *G. neotropica* for the COI mtDNA sequences. Knowing that outcrossing cannot be tested for these organisms the phylogenetic criterion is prevalent to delineate species. Our results show that *G. cubensis* and *G. neotropica* refers to an artificial distinction that is not supported by distinct monophyletic clades for both genes. Besides microsatellite analysis in Venezuelan individuals suggests that neutral genetic diversity structure is better explained by geographic location of samples than by belonging to one or other species. Other studies pointed that these two species might be conspecific (Correa et al. 2011, Lounnas et al. *under review*). We here showed that *G. cubensis* and *G. neotropica* as described in previous studies (Bargues et al. 2012; Standley et al. 2013; Pujadas et al. 2015) are in reality two haplotypes of a same species. In some cases, the ancient geographical separation can drive to speciation. For instance, the systematic status has been questioned in another freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, which presented very distinct haplotypes on both sides of the Amazon River (Brazil and Venezuela). Thus the authors proposed to consider *B. glabrata* as a species complex knowing the amount of molecular divergence between haplotypes (Mavárez et al. 2002).

### ***Neutral genetic diversity within populations and demography dynamic of Galba cubensis-neotropica***

Our analyses indicated that, at a global scale, this species has low genetic diversity and shows large departure from Hardy-Weinberg equilibrium and marked population structure, as evidenced by high  $F_{st}$  values. These results are consistent with its self-fertilizing mating system (Lounnas et al. *under review*). We confirmed here that the selfing rate is generally high.

Selfers are expected to have lower genetic diversity than out-crossers (Järne & Charlesworth 1993) and reduced effective recombination rates due to low heterozygosity (Charlesworth et al. 1993), as observed here. However, two American populations (Lowo and Tepe) exhibited a low selfing rate, and deserve further attention, e.g. by analysing life-history traits and inbreeding depression (Escobar et al. 2011), to evaluate whether these are

genuine cases of low selfing in an otherwise outcrossing species. Such an intraspecific variation, an important fact when considering the transition between low and high selfing rates, has not been detected up to now in freshwater hermaphroditic snails (Escobar *et al.* 2011).

Despite a very high self-fertilization we found 161 multilocus genotypes and no genotypic disequilibrium in the majority pairs of loci. This result suggests that *Galba cubensis* could maintain its populations with little extinction-recolonization dynamics promoting coexistence between different multilocus genotypes through time. This pattern differs from some other freshwater lymnaeids (e.g. *Pseudosuccinea columella*, *G. truncatula* and *G. schirazensis*) which proved to have strong and frequent founder effects generally driving to the fixation of one genotype per population (Lounnas *et al.* *under review*; Lounnas *et al.* *in prep.*; (Meunier *et al.* 2001, 2004)).

### ***Ancient versus recent colonization: two different genetic signatures in Galba cubensis-neotropica colonization history***

#### *Ancient colonization*

*Galba cubensis* was originally described from Cuba in 1835 by Pfeiffer but the few sites sampled in North America exhibited the highest genetic diversity for nuclear microsatellites, COI and ITS2. Furthermore, the North-American clade is basal in the ML tree and several genotypes and haplotypes found in USA populations were not found in any other populations outside North America. These facts suggest that *G. cubensis* might have a North American origin. North American populations grouped with some Cuban populations in microsatellite analysis (group C). Moreover an accumulation of neutral genetic diversity but a unique ITS-2 haplotype was found in Cuba and some Cuban genotypes/haplotypes were found in USA. Geographic, genetic proximity and historical records suggest an ancient introduction in Cuba from south USA. The genotypic diversity in Cuba can be the result of mutation accumulation from a unique introduction or repeated introductions. The significant isolation by distance in the island would suggest a mutation accumulation from a unique introduction but unfortunately COI data are missing to better understand this pattern at an intermediate time.

Interestingly the genotype and haplotype from Argentina, Uruguay and Peru are not found elsewhere, and are somewhat divergent from other genotypes/haplotypes (group A), suggesting that our sample is not representative of the variability reservoir of *G. cubensis*. This ancient North-South divergence in South America has been found in other freshwater snails as *P. columella* or *Biomphalaria glabrata* (Mavárez *et al.* 2002; Lounnas *et al.* *under review*). Several phylogeographic studies in the Neotropics showed that the Amazon rivers and the equatorial forest have act as a gene flow barrier for non-forest dwelling organisms

after the glaciation period during the Pleistocene (Dejong *et al.* 2003; Caragiulo *et al.* 2014). Our result suggest that *G. cubensis* has been split in two clades during this period, causing the emergence of a Southern group (group A) genetically differentiated from other northern populations (group B, C and D).

#### *Recent colonization*

Other genotypes/haplotypes were detected in (1) Colombia and Ecuador (group D) and (2) Caribbean Islands and Venezuela (group B). Genotypes in both groups are also close from those found in the USA, suggesting that several independent introductions have occurred in South America and the Caribbean. The genetic proximity between Venezuelan and Caribbean populations suggests colonization from North America to South America by Cuba and then Caribbean Islands to Venezuela. This phylogeographic scenario have been demonstrated in other freshwater snails as *Biomphalaria glabrata* (Dejong *et al.* 2003) and *Biomphalaria straminea*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. Indeed Venezuelan haplotypes for these species are genetically close to haplotypes from Lesser Antilles. However, authors concluded to an introduction from South America to Caribbean islands because these species were supposed to be originated from South America (Mavárez *et al.* 2002; Dejong *et al.* 2003).

Populations from Ecuador shared a unique genotype, which is consistent with the suspected recent invasion of *G. cubensis* in this country (Lounnas *et al.* prep). This result showed a drastic loss of genetic diversity associated with biological invasions which is not uncommon in invasive snails as reported for *Lymnaea stagnalis* in New Zealand (Kopp *et al.* 2012), *Galba truncatula* in the Bolivian Altiplano (Meunier *et al.* 2001) and *Pseudosuccinea columella* in the new world (Lounnas *et al.* Under review). Indeed in the initial phase of introduction, the introduction ways or vectors are associated with strong demographic stochasticity, including flooding, transport by birds, or aquarium trade (Madsen & Frandsen 1989; Duggan 2010). This however leads to a “genetic paradox”, since many invasive species manage to persist in new environment, despite low variation (Roman & Darling 2007; Cristescu 2015). Our results suggest that the invasiveness of *G. cubensis* is certainly possible due to a good tolerance to environment perturbation coupled with recurrent introductions, as shown in the snail *Melanoides tuberculata* where multiple introductions increase the genetic variance and adaptability (Facon *et al.* 2008).

To conclude, ancient colonization events in Cuba or more recently in Venezuela present signs of multiple introductions while recent colonization drive to highly reduced genetic diversity and low degree of differentiation (e.g. group D, Colombia-Ecuador). These results suggest that *G. cubensis* is a species able to re-found populations from few

individuals and at the same time able to maintain populations through time accumulating neutral genetic diversity.

### ***Implications for Fascioliasis***

The presence of newly introduced populations that are highly depleted in genetic diversity as in Ecuador, would probably favour the spread of *F. hepatica* as the parasite would encounter little genetic variation and could freely expand (Altermatt & Ebert 2008; Lively 2010). Knowledge about the epidemiology of fascioliasis in Ecuador is scarce and for now the only recognized species as intermediate host is *Galba cousini* (Villavicencio & Vasconcellos 2005). Our results suggest considering *G. cubensis* as an epidemiological threat in this country.

Colonization of freshwater snails serving as intermediate hosts for Digeneans may represent a hazard for human and veterinary health. *G. cubensis* is the most widely distributed intermediate host of *F. hepatica* in the Neotropics. Ancient colonization by *G. cubensis* may have facilitated the spread of *F. hepatica* in the Americas in ancient time scale and human activities had probably play a crucial role in the recent invasion by this snail of medical and veterinary importance.

## REFERENCES

- Altermatt F, Ebert D (2008) Genetic diversity of *Daphnia magna* populations enhances resistance to parasites. *Ecology Letters*, **11**, 918–928.
- Avise JC (2000) *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press.
- Baker HG (1967) Support for Baker's law-as a rule. *Evolution*, **21**, 853–856.
- Bargues MD, Artigas P, Khoubbane M et al. (2012) Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & vectors*, **5**.
- Bargues MD, Artigas P, Mera Y Sierra RL, Pointier JP, Mas-Coma S (2007) Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **101**, 621–41.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (1998) GENETIX, software for population genetic data analysis, Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060. *Université de Montpellier II, Montpellier, France*.
- Bousset L, Pointier JP, David P, Jarne P (2014) Neither variation loss, nor change in selfing rate is associated with the worldwide invasion of *Physa acuta* from its native North America. *Biological Invasions*, **16**, 1769–1783.
- Burney CW, Brumfield RT (2009) Ecology predicts levels of genetic differentiation in neotropical birds. *The American naturalist*, **174**, 358–368.
- Caragiulo A, Dias-Freedman I, Clark JA, Rabinowitz S, Amato G (2014) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of Neotropic pumas (*Puma concolor*). *Mitochondrial DNA*, **25**, 304–312.
- Charlesworth B, Morgan MT, Charlesworth D (1993) The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics*, **134**, 1289–1303.
- Correa AC, Escobar JS, Noya O et al. (2011) Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 1978–1988.
- Cristescu ME (2015) Genetic reconstructions of invasion history. *Molecular Ecology*, **24**, 2212–2225.
- David P, Pujol B, Viard F, Castella V, Goudet J (2007) Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, **16**, 2474–2487.
- Dejong RJ, Morgan J a. T, Wilson WD et al. (2003) Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics. *Molecular Ecology*, **12**, 3041–3056.
- Duggan IC (2010) The freshwater aquarium trade as a vector for incidental invertebrate fauna. *Biological Invasions*, **12**, 3757–3770.
- Elton CS (1958) *The ecology of invasions by plants and animals*. Methuen, London, vol.18.
- Escobar JS, Auld JR, Correa AC et al. (2011) Patterns of mating-system evolution in hermaphroditic animals: correlations among selfing rate, inbreeding depression, and the timing of reproduction. *Evolution; international journal of organic evolution*, **65**, 1233–53.
- Facon B, Pointier J-P, Jarne P, Sarda V, David P (2008) High genetic variance in life-history strategies within invasive populations by way of multiple introductions. *Current biology : CB*, **18**, 363–7.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of

- mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–9.
- Gao H, Williamson S, Bustamante CD (2007) A Markov chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. *Genetics*, **176**, 1635–51.
- Goudet J (2003) Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from: <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html> Updated from Goudet (1995).
- Haffer J (1997) Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: An overview 8. *Biodiversity and Conservation*, **6**, 451–476.
- Hartl D, Clark H (1997) Principles of population genetics. *Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA*.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J et al. (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular phylogenetics and evolution*, **54**, 291–301.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 254–67.
- Jarne P, Charlesworth D (1993) The evolution of the selfing rate in functionally hermaphrodite plants and animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 441–466.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, **6**, 13.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, **11**, 94.
- Karatayev AY, Burlakova LE, Karatayev V a., Padilla DK (2008) Introduction, distribution, spread, and impacts of exotic freshwater gastropods in Texas. *Hydrobiologia*, **619**, 181–194.
- Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in ecology & evolution*, **16**, 199–204.
- Kopp KC, Wolff K, Jokela J (2012) Natural range expansion and human-assisted introduction leave different genetic signatures in a hermaphroditic freshwater snail. *Evolutionary Ecology*, **26**, 483–498.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **25**, 1451–1452.
- Lively CM (2010) The effect of host genetic diversity on disease spread. *The American naturalist*, **175**, E149–E152.
- Löytynoja A, Goldman N (2010) webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. *BMC Bioinformatics*, **11**, 579.
- Madsen H, Frandsen F (1989) The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, **46**, 139–146.
- Mavárez J, Steiner C, Pointier J-P, Jarne P (2002) Evolutionary history and phylogeography of the schistosome-vector freshwater snail *Biomphalaria glabrata* based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Heredity*, **89**, 266–72.
- Meirmans PG, Van Tienderen PH (2004) GENOTYPE and GENODIVE: Two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, **4**,

792–794.

- Meunier C, Hurtrez-Bousses S, Durand P, Rondelaud D, Renaud F (2004) Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Ecology*, **13**, 2535–2543.
- Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S et al. (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular Ecology*, **10**, 1333–1340.
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB (2000) Diversification of the rainforest fauna: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 533–563.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106**, 283 – 292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 3321–3323.
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, **41**, 225–233.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 583–590.
- Nicot A, Dubois M-P, Debain C, David P, Jarne P (2008) Characterization of 15 microsatellite loci in the pulmonate snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Molecular ecology resources*, **8**, 1281–4.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Paraense WL (1983) A survey of Planorbid molluscs in the amazonian region of brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **78**, 343–361.
- Pointier J-P (2015) *Freshwater Molluscs of Venezuela and their Medical and Veterinary Importance*. ConchBooks.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–59.
- Pujadas JM, Farber M, Pointier J-P et al. (2015) New record for *Galba neotropica* (d'Orbigny, 1835) in Argentina, with a detailed analysis of its morphology and molecular characteristics. *Molluscan Research*, **35**, 153–160.
- Roman J, Darling J a (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in ecology & evolution*, **22**, 454–64.
- Ronquist F, Huelsenbeck J, Teslenko M (2011) Draft MrBayes version 3 . 2 Manual : Tutorials and Model Summaries.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219–1228.
- Standley CJ, Prepelitchi L, Pietrokovsky SM et al. (2013) Molecular characterization of cryptic and sympatric lymnaeid species from the Galba/Fossaria group in Mendoza Province, Northern Patagonia, Argentina. *Parasites & Vectors*, **6**, 304.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725–2729.
- Villavicencio A, Vasconcellos MC De (2005) First report of *Lymnaea cousinsi* Jousseaume,

- 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 735–7.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, **38**, 1358 – 1370.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Society for the Study of Evolution*, **19**, 395–420.

### **Acknowledgements**

Part of this work has been supported by University Montpellier (“contrat doctoral” fellowship to ML), by IRD (grant BEST to AV) and by University of Montpellier, CNRS and IRD.

We are most grateful to Dr Barbara Holcman and Oscar Castro, Facultad Veterinaria, Montevideo, Uruguay, who kindly sent a Paysandú sample of *Galba cubensis*.

### **Data Accessibility**

Sequences data have been deposited in Genbank

### **Authors' contributions**

ML performed DNA extraction, molecular data, analysis and drafted the manuscript; PA and AAV contributed to molecular analyses; PJ and JPP revised the manuscript; SHB coordinated the study and revised the manuscript. All authors contributed to sample collection, read and approved the final manuscript.

### **Figure legends:**

**Figure 1: Sampling map of *Galba cubensis/neotropica*.** (n) represents number of individuals analysed with microsatellite markers. This figure was obtained with R studio, using the package *rgdal* and reworked using Adobe Illustrator.

**Figure 2: Population genetic structure in *Galba cubensis/neotropica* estimated through a discriminant analysis of principal components.** Scatter plot of the first two component (first axis: 30% of the cumulative variance; second axis: 52% of the cumulative variance) of 907 individuals genotyped at 15 microsatellite markers and previously assigned to 16 genetic clusters. The four sub-groups are indicated by letter codes. Arrows locate populations belonging to two different sub-groups. This figure was obtained with R studio, using the package *adegenet* and reworked using Adobe Illustrator.

**Figure 3: Phylogenetic tree of *Galba cubensis* based on ITS-2 sequences (A) and mtCOI sequences (B).** The topology presented here is inferred by maximum likelihood and Bayesian inference. Maximum-likelihood bootstrap values and posterior probabilities and for each node are indicated in that order. Each phylogenetic clade is indicated by a colour. The same colour is used for the corresponding haplotype (Fig S2).

**Table 1.** Population genetic parameters of *Galba cubensis* based on 15 microsatellite loci.

N: number of individuals; PL: number of polymorphic loci; nMLG : number of multi locus genotypes; Na: number of alleles; AR: mean allelic richness rarefied to N = 4 individuals; Ho: observed heterozygosity; He: within population gene diversity; S: selfing rate; S\*: selfing rates with confidence interval (CI) obtained with RMES.

Country	Population	N	PL	nMLG	Na	AR	Ho	He	F <sub>IS</sub>	S	S* [95%CI]
ARG	Bass	8	5	5	1.333	1.296	0.038	0.100	0.622	0.767	0.952 [0.886, 0.997]
ARG	Canz	8	5	2	1.400	1.412	0.017	0.201	0.917	0.957	---
ARG	Cons	8	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
ARG	Guti	8	0	1	1.000	1.066	0.000	0.000	---	---	---
ARG	Spad	8	3	4	1.267	1.226	0.000	0.084	1.000	1.000	---
ARG	Zava	9	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
COL	Prog	48	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
CUBA	Baho	23	1	2	1.067	1.040	0.000	0.013	1.000	1.000	0.951 [0.844, 0.978]
CUBA	Bat	17	7	9	1.600	1.380	0.027	0.154	0.824	0.904	0.942 [0.000, 0.988]
CUBA	Coma	17	6	7	1.400	1.372	0.009	0.084	0.891	0.942	---
CUBA	Padi	10	7	7	1.467	1.401	0.016	0.188	0.916	0.956	---
CUBA	Tri	32	13	16	2.600	<b>2.187</b>	0.003	0.469	0.994	0.997	0.000 [0.000, 0.976]
CUBA	V503	17	3	5	1.200	1.118	0.000	0.041	1.000	1.000	0.000 [0.000, 0.917]
CUBA	AB	26	4	4	1.267	1.219	0.003	0.100	0.972	0.987	0.984 [0.915, 0.999]
CUBA	DD	14	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
CUBA	EE	22	5	6	1.400	1.203	0.013	0.040	0.669	0.802	---
CUBA	V126	17	8	5	1.533	1.334	0.021	0.129	0.838	0.912	0.000 [0.000, 0.980]
CUBA	ZP	26	2	3	1.133	1.047	0.003	0.014	0.796	0.886	---
ECU	Nara	10	3	2	1.267	1.219	0.000	0.089	1.000	1.000	---
ECU	LDP	45	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
ECU	LG	46	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
ECU	Yag	44	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
GUA	Pin	21	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
GUA	Barb	27	1	2	1.067	1.010	0.002	0.002	-0.000	0.000	---
MAR	Rob	44	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
PER	Moq	46	1	1	1.067	1.191	0.000	0.004	1.000	1.000	0.958 [0.000, 0.991]
PER	Oco	12	4	4	1.267	1.221	0.000	0.097	1.000	1.000	0.000 [0.000, 0.961]
PER	Lur	52	6	7	1.467	1.145	0.007	0.031	0.765	0.867	---
PER	Cama	6	1	2	1.067	1.066	0.017	0.017	0.000	0.000	---
PUERI	PUERI	10	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
URU	Pay	11	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---
USA	Char	7	7	5	1.600	1.557	0.000	0.230	1.000	1.000	---
USA	Flor	10	2	4	1.200	1.103	0.007	0.028	0.737	0.849	-
USA	LoLa	10	5	3	1.333	1.217	0.007	0.070	0.905	0.950	0.000 [0.000, 0.965]
USA	LoWo	10	14	5	3.429	<b>3.126</b>	0.280	0.645	0.566	0.723	<b>0.538</b> [0.361, 0.698]
USA	Sull	10	8	5	1.733	1.711	0.010	0.221	0.957	0.978	0.920 [0.886, 0.982]
USA	TePe	10	15	6	4.000	<b>3.677</b>	0.390	0.710	0.451	0.622	<b>0.339</b> [0.115, 0.459]
VEN	Lafin	8	5	5	1.333	1.269	0.000	0.091	1.000	1.000	---
VEN	Mesa	31	2	3	1.133	1.072	0.000	0.026	1.000	1.000	---
VEN	Cali	10	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	0.975 [0.967, 0.999]

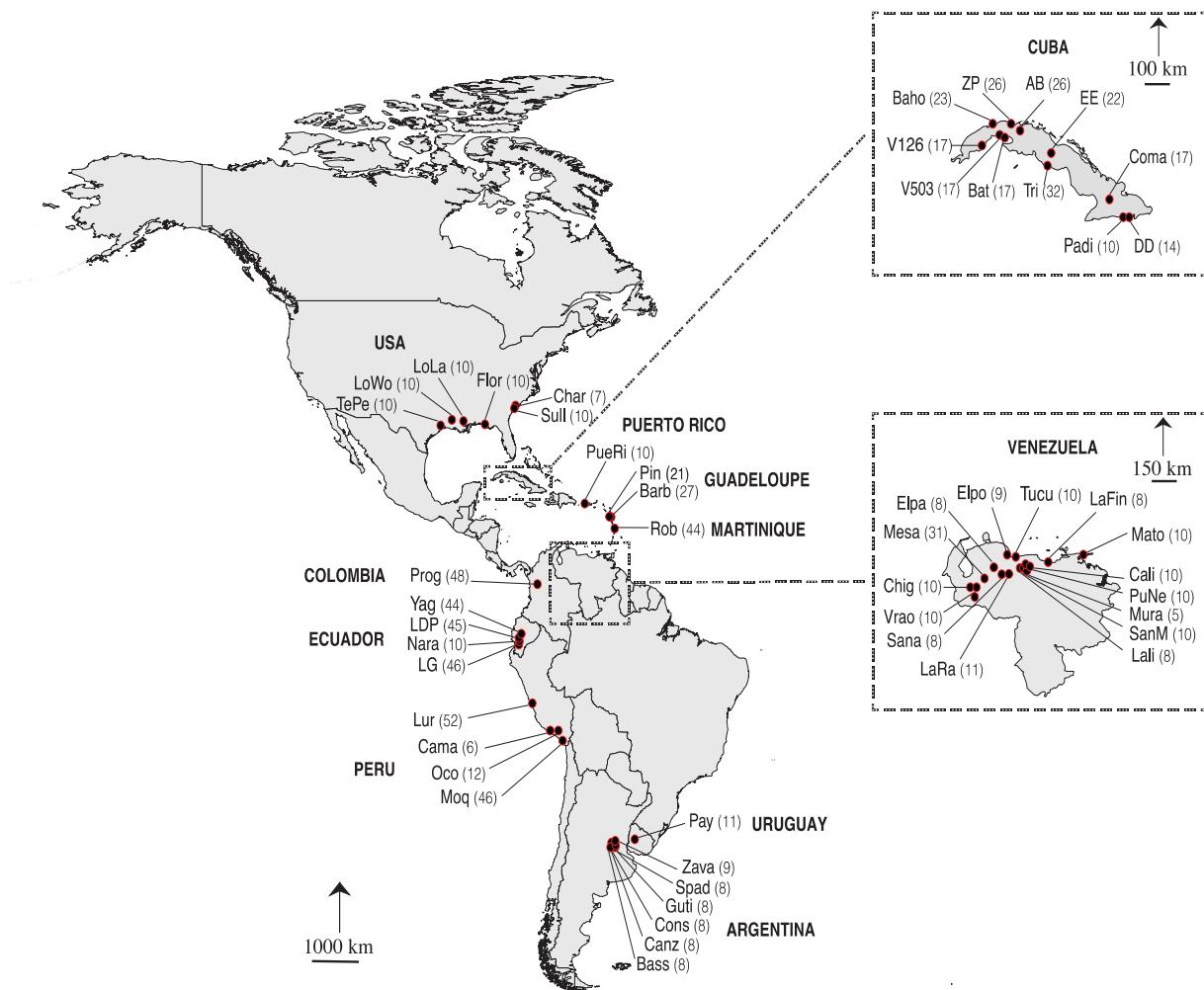
VEN	Chig	10	1	2	1.067	1.065	0.000	0.031	1.000	1.000	---	
VEN	Elpa	8	4	4	1.267	1.353	0.011	0.127	0.912	0.954	---	
VEN	Elpo	9	1	2	1.067	1.066	0.000	0.033	1.000	1.000	---	
VEN	Lali	8	0	1	1.000	1.051	0.000	0.000	---	---	---	
VEN	LaRa	11	1	2	1.067	1.057	0.000	0.022	1.000	1.000	---	
VEN	Mato	10	4	3	1.267	1.226	0.000	0.086	1.000	1.000	---	
VEN	Mura	5	0	1	1.000	1.000	0.000	0.000	---	---	---	
VEN	PuNe	10	4	3	1.267	1.247	0.000	0.125	1.000	1.000	---	
VEN	Sana	8	1	2	1.067	1.066	0.000	0.036	1.000	1.000	---	
VEN	SanM	10	3	3	1.267	1.213	0.000	0.085	1.000	1.000	---	
VEN	Tucu	10	7	3	1.538	1.729	0.000	0.282	1.000	1.000	---	
VEN	Vrao	10	1	2	1.067	1.060	0.000	0.024	1.000	1.000	---	
			907	15	161	12.067 ±1.067	1.270 ±0.49	0.017 ±0.065	0.091 ±0.149	0.857 ±0.251	0.893 ±0.234	

**Table 2.** Haplotypes obtained for the mtDNA : ITS2 (grey lines) and COI (white lines) genes.

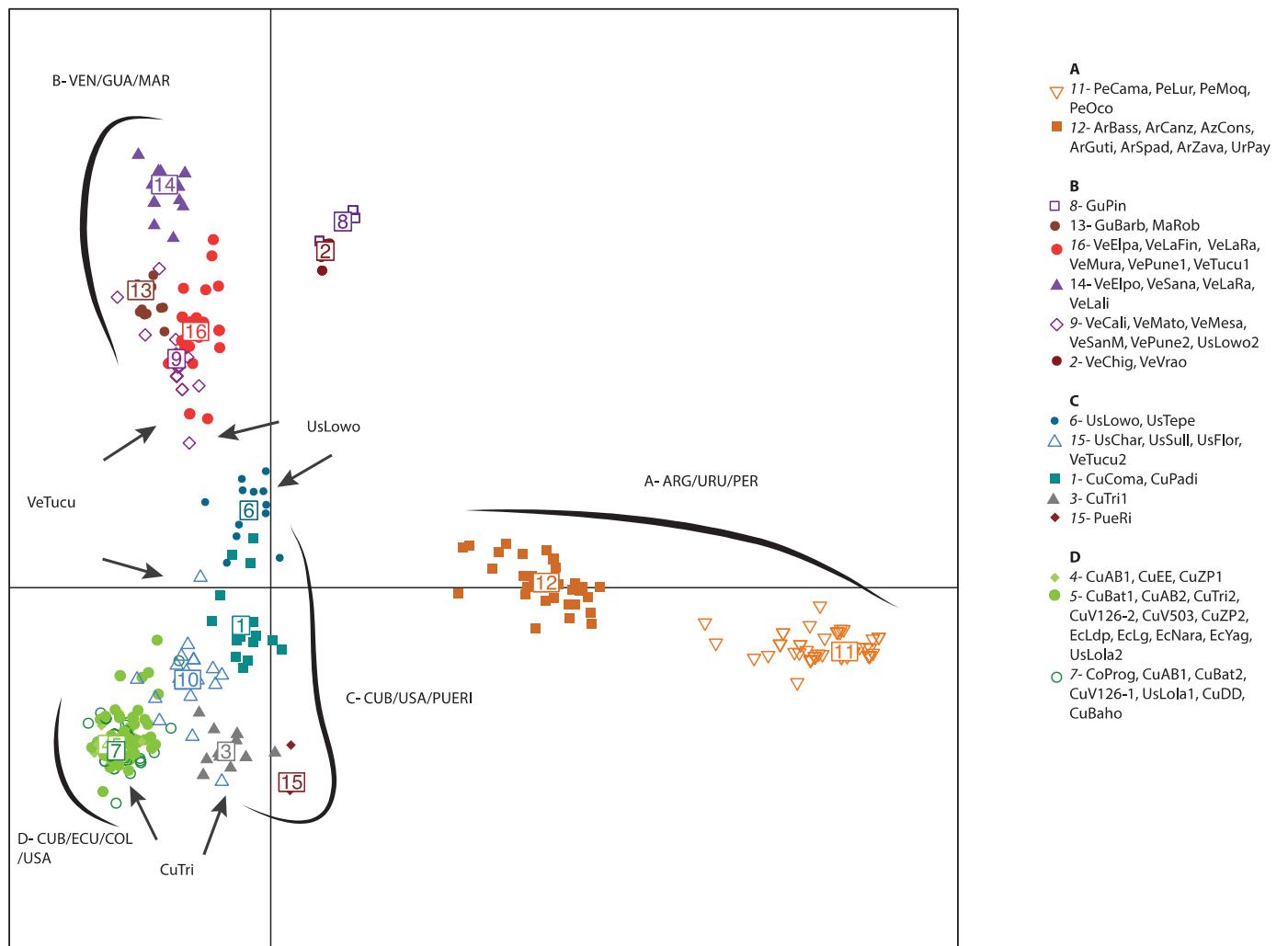
*n* = number of sequences used; *nHap.* = number of haplotypes per locality;  $\pi$  = nucleotide diversity.

Location		Haplotypes	<i>n</i>	<i>n Hap</i>	$\pi$ ( $\pm$ SD)	Hd ( $\pm$ SD)	
<b>North America</b>	South USA	C, D, E and G	5	4	0.025 ( $\pm$ 0.005)	0.933 ( $\pm$ 0.122)	
		A, B, G and I	8	4	0.022 ( $\pm$ 0.003)	0.786 ( $\pm$ 0.113)	
<b>Caribbean islands</b>	Cuba	G	8	1	-	0.000 ( $\pm$ 0.000)	
		-	-	-	-	-	
	Guadeloupe	G	2	1	-	0.000 ( $\pm$ 0.000)	
		H	1	1	-	-	
	Puerto Rico	G	2	1	-	0.000 ( $\pm$ 0.000)	
		-	-	-	-	-	
<b>Northern South America</b>	Ecuador	F and G	17	2	0.001 ( $\pm$ 0.001)	0.400 ( $\pm$ 0.237)	
		I	5	1	-	-	
	Venezuela	B and G	4	2	0.014 ( $\pm$ 0.005)	0.309 ( $\pm$ 0.122)	
		E and F	9	2	0.009 ( $\pm$ 0.001)	0.556 ( $\pm$ 0.090)	
<b>Southern South America</b>	Peru	A	8	1	-	0.000 ( $\pm$ 0.000)	
		C	2	1	-	-	
	Argentina	A	6	1	-	0.000 ( $\pm$ 0.000)	
		C and D	5	2	0.001 ( $\pm$ 0.001)	0.400 ( $\pm$ 0.237)	
<b>All populations</b>			<b>52</b>	<b>7</b>	<b>0.0176 (<math>\pm</math> 0.002)</b>	<b>0.588 (<math>\pm</math> 0.060)</b>	
			<b>30</b>	<b>9</b>	<b>0.0166 (<math>\pm</math> 0.020)</b>	<b>0.786 (<math>\pm</math> 0.113)</b>	

**Figure 1.**

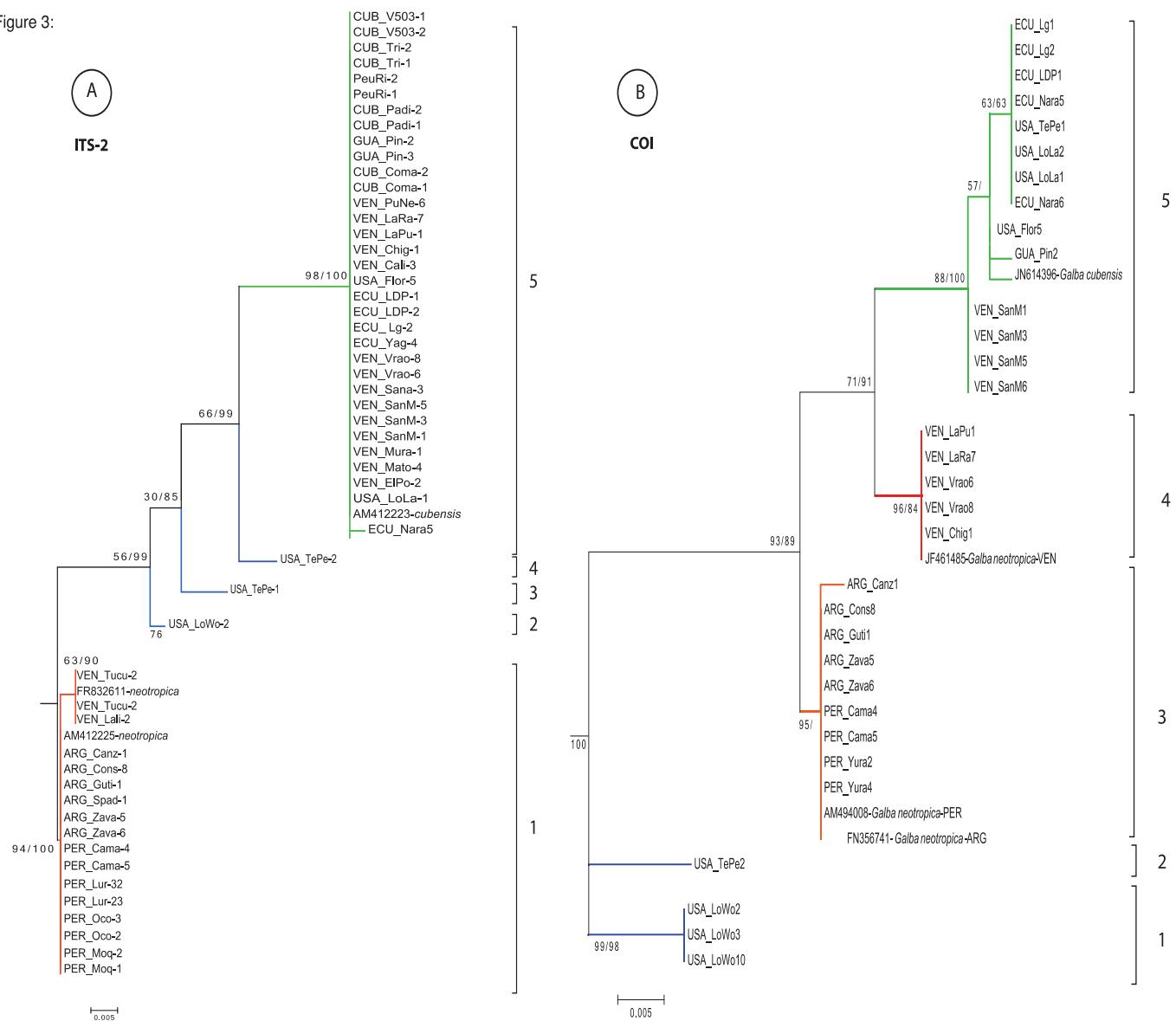


**Figure 2.**



**Figure 3.**

Figure 3:



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

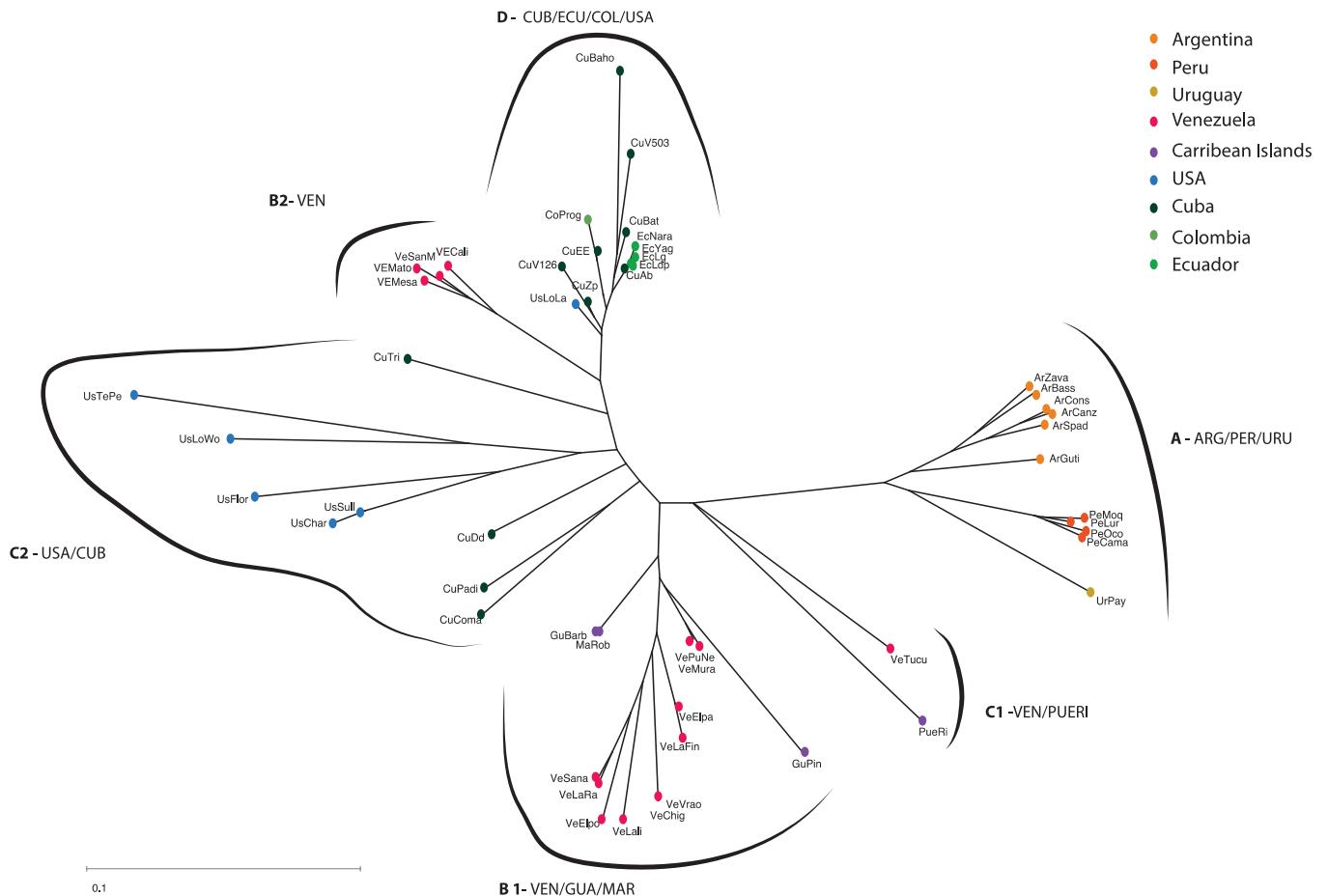
**Table S1.** Geographic origin, sampling year and GenBank accession number of the sampled populations.

Rows are sorted by countries and populations. \* = Populations identified in Alda *et al.* (in prep). NA = Genbank accession not available

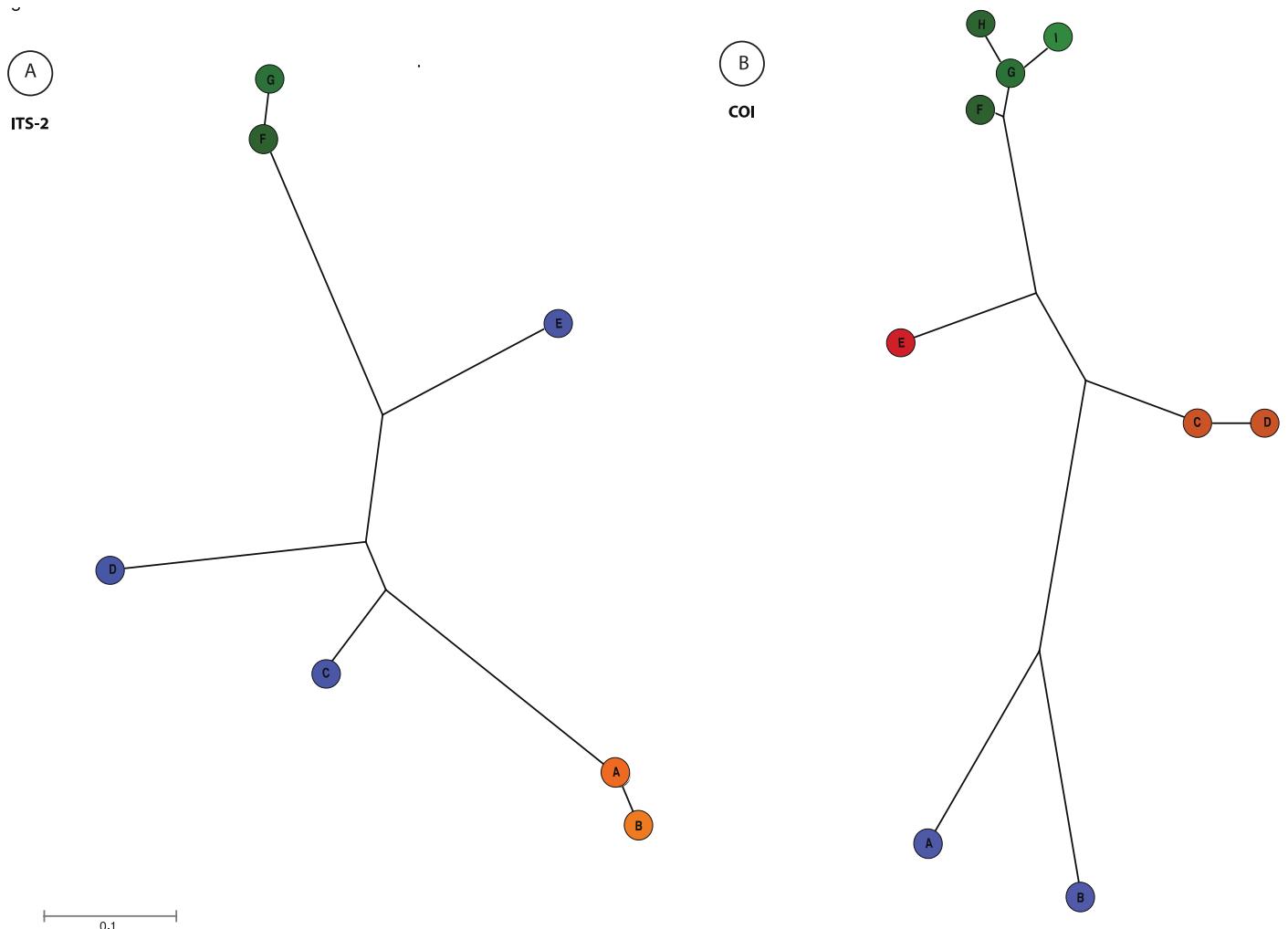
Country	Population	Location	Latitude	Longitude	Year	ITS-2	COI
ARG	Bassi*	Bassi	S 33° 06' 01"	W 60° 51' 03"	2013	KT781167	-
ARG	Canz*	Canzani	S 33° 24' 38"	W 60° 38' 59"	2013	KT781168	KT781297
ARG	Consorti		S 33° 28' 45"	W 60° 34' 41"	2013	KT781169	KT781298
ARG	Guti*	Gutiérrez	S 33° 23' 25"	W 61° 31' 39"	2013	KT781171	KT781299
ARG	Spad*	Spadoni	S 33° 06' 07"	W 61° 14' 27"	2013	KT781172	KT781300
ARG	Zava*	Zavalla	S 33° 02' 12"	W 60° 54' 32"	2013	KT781173-74	KT781277-78
COL	Prog	El Progreso - El Hatillo	N 06° 12' 01"	W 75° 35' 06"	2009	-	-
CUBA	Baho	Bahia Honda	N 22° 54' 09"	W 83° 10' 16"	2003	-	-
CUBA	Bat	Batabano	N 22° 44' 31"	W 82° 17' 21"	2002	-	-
CUBA	Coma	Contramaestre	N 20° 30' 08"	W 76° 26' 40"	2003	NA	-
CUBA	Padi	Parque de Diversiones - Santiago	N 20° 02' 12"	W 75° 53' 06"	2003	NA	-
CUBA	Tri	Rio El Junco - Jibacoa -Trinidad	N 21° 43' 57"	W 79° 33' 23"	2002	NA	-
CUBA	V503	Vaqueria 503 - Alquizar	N 22° 43' 52"	W 82° 39' 34"	2003	NA	-
CUBA	AB	Vaquería Alfa B	N 22° 43' 52"	W 82° 39' 34"	-	-	-
CUBA	DD	Desagüe Distrito 1	N 20° 02' 09"	W 75° 50' 14"	-	-	-
CUBA	EE	Arroyo Empresa Eléctrica	N 21° 56' 46"	W 79° 26' 08"	-	-	-
CUBA	V126	Vaquería 126 Loma Candelaria	N 22° 34' 36"	W 83° 22' 49"	-	-	-
CUBA	ZP	Zanja Pastorita	N 23° 06' 33"	W 82° 22' 31"	-	-	-
ECU	Nara*	Naranjal	S 02° 22' 35"	W 79° 37' 53"	2013	-	KT461812-13
ECU	LDP*	Las Dos Puertas	S 01° 56' 01"	W 79° 34' 38"	2014	KT461817-18	KT461809
ECU	LG*	La Gloria	S 02° 16' 59"	W 79° 30' 51"	2014	KT461815-16	KT461810-11
ECU	Yag*	Yaguachi	S 02° 05' 34"	W 79° 42' 30"	2014	KT461814	-
GUA	Pin	Pinadière	N 16° 19' 18"	W 61° 22' 08"	-	NA	NA
GUA	Barb	Fond Barbotteau	N 16° 10' 04"	W 61° 39' 11"	2003	NA	-
MAR	Rob	Ravine Mansarde au Robert	N 14° 40' 29"	W 60° 56' 26"	2011	-	-
PER	Moq	Moquegua	S 17° 19' 24"	W 70° 59' 29"	2012	NA	-
PER	Oco*	Ocoña	S 16° 25' 17"	W 73° 06' 56"	2012	NA	-
PER	Lur	Rio Lurin	S 12° 06' 07"	W 76° 47' 17"	2012	NA	-
PER	Cama*	Camaná Puente	S 16° 35' 09"	W 72° 43' 55"	2012	KT781180-81-82	KT781279-80-81
PUERI	PUERI	Puerto Rico	N 18° 06' 12"	W 66° 33' 23"	1998	NA	-
URU	Pay	Paysandú	S 32° 19' 40"	W 57° 29' 10"	1996	-	-
USA	Char	South Carolina - Charleston	N 32° 45' 59"	W 79° 49' 35"	-	-	-
USA	Flor*	Florida - Pensacola Coy Burgess	N 30° 41' 18"	W 86° 07' 23"	2012	KT781225	KT781331
USA	LoLa*	Louisiana- Laplace	N 30° 51' 13"	W 90° 26' 35"	2012	KT781187-88	KT781286-87

USA	LoWo*	Louisiana - Wood Worth	N 31° 11' 51"	W 92° 28' 28"	2012	KT781189	KT781288-89 KT781337
USA	Sull*	South Carolina - Sullivans	N 32° 45' 24"	W 79° 50' 10"	2009	-	-
USA	TePe*	Texas - Perlstein Park, Beaumont	N 30° 04' 03"	W 94° 11' 42"	-	KT781236-37	KT781341-42
VEN	LaFin*	La Finca	N 10° 20' 24"	W 66° 9.643"	2012	-	-
VEN	Mesa*	La Mesa de Esnujaque	N 09° 02' 19"	W 70° 42' 58"	2005	-	-
VEN	Cali*	Canal Calicanto Maracay	N 10° 15' 57"	W 67° 35' 16"	2001	NA	-
VEN	Chig*	Chiguara	N 08° 29' 37"	W 71° 32' 20"	2009	NA	KT781343
VEN	Elpa*	El Papelón	N 10° 04' 39"	W 70° 09' 17"	2007	-	-
VEN	Elpo*	El Porvenir	N 10° 32' 03"	W 68° 49' 59"	2006	NA	-
VEN	Lali*	La Linda - Güigüe	N 10° 05' 24"	W 67° 47' 25"	2006	KT781202	-
VEN	LaRa*	La Raya	N 09° 41' 00"	W 69° 14' 00"	2003	NA	KT781312
VEN	Mato*	Hato Río de Agua	N 10° 34' 48"	W 62° 59' 22"	2006	KT781205	-
VEN	Mura*	Mucura	N 10° 06.1'	W 67° 29' 48"	2000	KT781209	-
VEN	PuNe*	Puerta Negra	N 10° 06' 55"	W 67° 36' 25"	1998	KT781264	-
VEN	Sana*	La Quebradita Sanare	N 09° 44' 08"	W 69° 40' 04"	2005	KT781216	-
VEN	SanM*	San Mateo	N 10° 12' 41"	W 67° 24' 52"	2010	KT781213-14-15	KT781295-96
VEN	Tucu*	Tucacas	N 10° 46' 00"	W 68° 24' 00"	2001	KT781217-18	-
VEN	Vrao*	Laguna Urao	N 08° 30' 17"	W 71° 23' 43"	2013	KT781219-20	KT781327-28

**Figure S1: Unrooted Neighbour-Joining tree based on Cavalli-Sforza genetic distances among populations.** The nine different colours indicate the geographic origin of population. Each coloured circle and letter code refers to one population. The six arc of circles correspond to the genetic sub groups reported in the DAPC analysis (see Fig. 2).



**Figure S2: Neighbour-joining network based on ITS2 haplotypes (A) and COI haplotypes (B).** Each colour refer to a phylogenetic clade (see Fig. 3); each letter refers to one haplotype.



Revised version submitted to *Molecular Ecology*

## CLONE INVASION AS A HEALTH THREAT: THE CASE OF *PSEUDOSUCCINEA COLUMELLA* VECTOR OF FASCIOLOSIS

Lounnas<sup>1†\*</sup>, M., Correa<sup>1†</sup>, A.C., Vázquez<sup>1,2</sup>, A.A., Dia<sup>1</sup>, A., Pointier<sup>3</sup>, J.P., Nicot<sup>1</sup>, A., Escobar<sup>4,5</sup>, J.S., David<sup>6</sup>, P., Jarne<sup>6</sup>, P., Arenas<sup>7</sup>, J., Ayaqui<sup>8</sup>, R., Dubois<sup>6</sup>, M.P., Gimenez<sup>9</sup>, T., Gutiérrez<sup>2</sup>, A., González-Ramírez<sup>10</sup>, C., Loker<sup>11</sup>, E.S., Noya<sup>12</sup>, O., Prepelitchi<sup>13</sup>, L., Sánchez<sup>2</sup>, J., Uribe<sup>14</sup>, N., Visnivesky-Colli<sup>12</sup>, C., Yong<sup>2</sup>, M., Hurtrez-Boussès, S<sup>1,15\*</sup>.

† Equal contributors

\* Corresponding author

<sup>1</sup> MIVEGEC, UMR IRD 224 CNRS 5290 UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

<sup>2</sup> Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Apartado Postal 601, Marianao 13, La Habana, Cuba

<sup>3</sup> USR 3278 CNRS-EPHE, CRIODE Université de Perpignan, 68860 Perpignan-Cedex, France

<sup>4</sup> Institut des Sciences de l'Evolution, UMR 5554 CNRS, Université Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>5</sup> Current address: Vidarium Nutrition, Health and Wellness Research Center, Grupo Nutresa, Calle 8 sur #50-67, Medellín, Colombia

<sup>6</sup> Centre d'Ecologie Fonctionnelle et d'Evolution, UMR 5175, CNRS – Université de Montpellier – Université Paul Valéry Montpellier – EPHE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

<sup>7</sup> Facultad de Biología Marina, Universidad Científica del Sur, Perú

<sup>8</sup> Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú

<sup>9</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción, Casilla 1061, San Lorenzo, Paraguay

<sup>10</sup> Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas ‘Dr Jesús Moreno Rangel’ Cátedra de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Urb. Campo de Oro, 5101 Mérida, Venezuela

<sup>11</sup> Center for Evolutionary and Theoretical Immunology, Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM87131, USA

<sup>12</sup> Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela y Centro para Estudios sobre Malaria IAES-INH, MPPS, Caracas, Venezuela

<sup>13</sup> Unidad de Ecología de Reservorios y Vectores de Parásitos, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 4 piso, Laboratorio 55, Ciudad Autónoma de Buenos Aires C1428EGA, Argentina

<sup>14</sup> Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>15</sup> Département de Biologie-Ecologie (Faculté des Sciences)- cc 046- Université Montpellier, 4 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

**Corresponding author :** Manon Lounnas; MIVEGEC, UMR IRD 224 CNRS 5290 UM1-UM2, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

E-mail: Sylvie.hurtrez@ird.fr; manon.lounnas@gmail.com

**Keywords:** *Pseudosuccinea columella*, biological invasion, microsatellite, mitochondrial markers, population genetics

**Running title:** Genetic variability and biological invasions

**Word count:** 6375

**Table count:** 5

**Figure count:** 3

**Supporting information:** Lounnas\_etal\_suppinfo.doc

## ABSTRACT

Biological invasions pose problems not only to the invaded community but also to the invader itself. One of these problems is the possible reduced genetic variability of the introduced population. In the context of host-parasite interactions, low genetic variability in host populations can increase susceptibility to parasites. Combining the use of eight nuclear microsatellite markers and two mitochondrial genes we here study the genetic diversity of *Pseudosuccinea columella*, a worldwide distributed hermaphroditic freshwater snail. This invasive species is known to have recently extended its geographic distribution and to act as intermediate host of *Fasciola hepatica* the causative agent of fasciolosis. This study takes place at a global scale to assess the genetic patterns of its biological invasion and to test the proposed North American origin of introduced populations. Surprisingly, we found a unique genotype/haplotype in populations from eight different regions all over the world. In contrast, we found that populations of *P. columella* from the USA exhibit high genetic diversity for both genetic markers. In Cuba, we found that populations resistant to the infection with *F. hepatica* present a distinct genetic pattern. Our results demonstrate that (1) invasion by *P. columella* is followed by a drastic lost of genetic diversity, (2) genetic diversity is higher in USA than in the rest of localities, consistent with its purportedly geographic origin and (3) resistant populations to infection by *F. hepatica* are genetically distinct to susceptible populations. This study illustrates how population genetics can give us insight at the interface between biological invasion and host-parasite interaction.

## INTRODUCTION

During recent decades, several infectious diseases have appeared or resurged at an extent so important that they deserve our highest consideration (Jones *et al.* 2008; Brookes *et al.* 2014). More than 12% of human infectious diseases, belonging to all groups of pathogens, are considered as emerging or re-emerging (Woolhouse *et al.* 2005; Woolhouse & Gowtage-Sequeria 2005). The principal causes of (re-)emergence are social, demographic or ecologic changes (Cohen 2000; Woolhouse & Gowtage-Sequeria 2005). Among the latter, special emphasis has been put on biological invasions (Hulme 2014). Indeed, the International Union for Conservation of Nature considers diseases as a major driver behind the negative effects of invasion for 24 out of the 100 World's Worst Invasive Alien Species (Hatcher *et al.* 2012). Invasive species include parasites, vectors, reservoirs or plants offering new habitats for pathogens or vectors (see Hatcher *et al.* 2012 ; Dunn & Hatcher 2015 for review). Dramatic examples of emerging diseases are found among trematodes and their intermediate hosts, freshwater snails. For instance, several snails involved in the transmission of intestinal schistosomiasis, such as *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* or *B. tenagophila*, were introduced to Egypt in 1981 (Pflüger, 1982), to Asia in 1973 (Meier-Brook, 1974) and to Africa in the 1970's (Pointier *et al.*, 2005), respectively. Another trematode parasite of medical and veterinary importance, the liver fluke *Fasciola hepatica*, has been introduced into the New World during the last 400 years through cattle import (Mas-Coma *et al.* 2005). Recent studies have demonstrated that its main intermediate host in Europe and North Africa, the freshwater snail of the Lymnaeidae, *Galba truncatula*, has also been recently introduced to several South American countries which now suffer of this parasitic disease in livestock and even humans (Jabbour-Zahab *et al.* 1997). The liver fluke causes fasciolosis, a zoonosis with considerable impact on economy (e.g., productivity loss in attained cattle and sheep) and human health (up

to 20 million people are susceptible to contract the disease; Mas-Coma *et al.* 1999; Mas-Coma 2005; Gayo & Mera y Siera 2010).

To understand invasion processes and identify the potential risks they might represent, including the expansion of parasites of human and veterinary concern, it is of importance to monitor changes in genetic diversity between native and invasive populations. It has been demonstrated that many invasive species suffer a loss of genetic diversity in their introduced areas due to strong bottlenecks in founder populations (Meunier, Hurtrez-Boussès, *et al.* 2004; Ren *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006; Mergeay *et al.* 2006). Depleted genetic diversity in invasive populations can affect the host-parasite interaction by increasing the host vulnerability to parasites (King & Lively 2012). In the case of the intermediate hosts of *F. hepatica*, Meunier *et al.* (2001) demonstrated that *G. truncatula* suffered a drastic loss of genetic diversity in introduced populations from Bolivia (South America) compared with native populations from Europe. However, other studies indicated that bottlenecks and founder effects could be counter balanced by multiple introductions and local hybridization (Dlugosch & Parker 2008), which might explain why some invasive species maintain high levels of genetic diversity in the introduced areas (Kolbe *et al.* 2004; Bousset *et al.* 2014). For instance, Wu *et al.* (2015) showed that the gypsy moth *Lymantria dispar* presented evidence of hybridization between two subspecies and high genetic diversity in eastern Asia, where its invasion is a success. Likewise, the freshwater snail *Physa acuta* has invaded the whole world from its native area (North America) without any loss of genetic diversity or change in its selfing rate (Bousset *et al.* 2014).

The analysis of genetic variability within and between populations can also be used to reconstruct the routes of invasion (Estoup & Guillemaud, 2010; Bock *et al.*, 2014; Cristescu, 2015). This approach, called ‘invasion genetics’, has proved useful in many cases to explain a variety of genetic patterns following biological invasion (Bock *et al.* 2014). For instance, this

approach used on zooplankton organisms, considered to be exceptional dispersalists, revealed an unexpected high level of regional endemism and population-level differentiation, suggesting that geographical and/or ecological barriers restricted gene flow levels among populations (Cristescu 2015).

In this study, we focus on the case of one intermediate host of the liver fluke, the freshwater snail of the Lymnaeidae, *Pseudosuccinea columella*. This species serves as intermediate host of *F. hepatica* in several countries such as Australia (Boray *et al.* 1985), Brazil (Oliveira *et al.* 2002) and Argentina (Prepelitchi *et al.* 2011) where it was recently introduced. Since *P. columella* is a species that rapidly expands in all continents, it could represent a serious epidemiological risk in terms of the fasciolosis expansion. The snail was first described from Philadelphia at the dawn of the XIX century (USA, Say 1817). Until the beginning of the XX century, the distribution of *P. columella* was restricted to the eastern part of North America. Afterwards, it expanded to South America (Scott 1953; Harry & Hubendick 1964; Malek & Chrosciechowski 1964; Malek & Congswell 1980; Paraense 1983), then was accidentally introduced into the Pacific region, Africa and Europe (Hubendick 1951; Boray *et al.*, 1985; Pointier & Marquet, 1990; Brown 1994; Appleton 2003; De Kock & Wolmarans 2008; Grabner *et al.* 2014). Today, *P. columella* has a worldwide distribution probably linked to the trade of aquatic plants (Madsen & Frandsen 1989; Duggan 2010) but little is known about its invasion history and the epidemiological consequences of such an invasion.

Using the “invasion genetics” approach, we here perform the largest study to date on *P. columella* in terms of both sampled populations and genetic markers to try and assess how much genetic variability harbour invasive populations, infer the routes of biological invasion and pinpoint the potential geographic origin of the species. For this, we screen the genetic diversity of 80 populations collected in the last 16 years in 14 countries/localities distributed worldwide

by combining eight nuclear microsatellites and two mitochondrial markers. High-resolution microsatellite DNA loci allow comparisons of the genetic variation between native and invasive populations, and help elucidate the most likely sources of invasion and spreading pathways; microsatellites are expected to reflect events occurring at a recent timescale. Mitochondrial DNA sequences, on the other hand, are expected to reflect more ancient divergence events; they have the advantage of having small effective population size, short coalescent time and a matrilineal mode of inheritance.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sampling*

We sampled a total of 1509 individuals of *P. columella* in 80 sites ( $N_{\min}=2$ ;  $N_{\max}=84$  individuals) located in different countries/continents from diverse freshwater environments (ravines, rivers, lakes, ponds, ditches, canals and irrigation systems). All populations were sampled between 1996 and 2012, to the exception of a Venezuelan population collected in 1987 (Table 1). Worthy of particular attention are five populations of *P. columella* sampled in Cuba (LCCA, LCP, LCR, LCE and LBB; Table 1) which are the only known populations in the world that have been experimentally proven to be resistant to the infection by *F. hepatica* (Gutiérrez *et al.* 2003; Fernandez-Calienes *et al.* 2004). Snails were hand collected and immediately stored in 80% ethanol for further molecular analysis.

### **DNA extraction**

For each individual, DNA was extracted from the distal part of the foot. Extractions were performed using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according the manufacturer's instructions.

### **Microsatellite markers**

#### *Amplification and genotyping*

Each individual was genotyped at eight nuclear microsatellite loci, according to the protocols described in Nicot *et al.* (2008): PCO1 (GenBank accession number: EU04295), PCO2 (EU049296), PCO6 (EU049298), PCO7 (EU049299), PCO12 (EU049303), PCO13 (EU049304), PCO17 (EU049307) and PCO20 (EU049309). We retained these loci because of their high polymorphism and no detection of null alleles.

PCRs were performed in 10 µL final volumes including 0.2 µM of each primer and 10 ng of genomic DNA, 0.2 µL of *Taq* polymerase, 1 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM and 2 Tampon 5x. PCR conditions were as follow: 15 min activation of the HotStartTaq DNA polymerase at 94°C, 30 cycles including 30 s initial denaturation at 94°C, 90 s annealing at 55°C, and 60 s extension at 72°C, followed by 30 min of final extension at 60°C. For genotyping, 3 µL of diluted (1: 100) PCR products were pooled with 13 µL of HiDi Formamide and 0.2 µL of GeneScan-500 LIZ Size Standard, and analysed on an ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

### *Genetic diversity and population differentiation*

The genetic polymorphism of each population was determined using standard parameters, including the number of polymorphic loci, allelic richness, observed heterozygosity ( $H_o$ ) and gene diversity (Nei 1973) ( $H_s$ ; Nei 1977). These parameters were estimated using FSTAT 2.9.4 (Goudet 1995; Goudet 2003).

In addition, deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested for each population using Wright's F-statistics (Wright 1965). F-statistics were estimated at two spatial scales: within populations ( $F_{is}$ ) and among populations ( $F_{st}$ ).  $F_{is}$  and  $F_{st}$  were estimated using Weir & Cockerham (1984) unbiased estimators ( $f$  and  $\theta$  respectively), computed with FSTAT. Deviations from HWE were tested using randomization procedures: 10,000 permutations of alleles among individuals in each population ( $F_{is}$ ) and among populations ( $F_{st}$ ) (Goudet 1995; Goudet *et al.* 1996). 95% confidence intervals were obtained by bootstrapping over loci. In addition, we estimated the average selfing rate of each population as  $s = 2F_{is}/(1+F_{is})$  (Hartl & Clark 1997). Because our populations mostly contained homozygotes, whenever possible we used a corrected selfing rate estimate on the basis of the distribution of multilocus heterozygosity implemented on the RMES software (David *et al.* 2007).

Allelic richness and gene diversities were compared between populations from USA, Colombia, Cuba, Venezuela, Peru and recently founded populations from other regions of the world (Madagascar, Mayotte, South Africa, La Reunion Island, French Polynesia, Guadeloupe and France). Multiple comparisons were done using ANOVA (gene diversities were arc-sin-square-root transformed) followed by Tukey post-hoc tests.

Isolation by distance was tested using the Mantel test implemented in the Isolation by Distance Web Service (Jensen *et al.* 2005). We used the shortest distance between two-sample points as the geographic distance and the logarithm of  $F_{st}/(1-F_{st})$  as the genetic distance.

### *Bayesian cluster analysis and microsatellite network*

To gain deeper insight into the genetic structure of populations and obtain a more synthetic view of the organization of the molecular variation, we performed three complementary analyses. First, we carried out a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC), implemented in the *adegenet* package (Jombart *et al.* 2010). This analysis allows identification of clusters of genetically related individuals by taking into account the population information. One of the main advantages of the DAPC method is that it does not rely on a particular population genetic model, and is thus free of assumptions about Hardy-Weinberg equilibrium or linkage disequilibrium. Second, we used a Bayesian clustering method to determine the probability that each individual genotype occurs in a given cluster using InStruct (Gao *et al.* 2007). We preferred InStruct to Structure (Pritchard *et al.* 2000) because we dealt with a hermaphroditic mostly self-fertilizing species (Nicot *et al.* 2008). Third, we reconstructed a neighbour-joining (NJ) network based on a genetic distance matrix between populations, using the Nei and Li genetic distance implemented in the software SplitsTree4 (Huson & Bryant 2006).

### **Mitochondrial DNA**

#### *Amplification and sequencing*

For mtDNA analyses, we randomly selected one snail from each population, excepting populations from the USA that have high genetic variance (see Results) in which we retained two individuals. We amplified a fragment of the mitochondrial gene COI (cytochrome oxydase, subunit I) using primers LCO1490 (5'- GGTCAACAACTCATCAAAGATATTGG-3') and

HCO2198 (5'- TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.* 1994) and a fragment of the mitochondrial gene 16S using the primers 16S-F (5'- CGCCTGTTATCAAAACAT-3') and 16S-R (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Remigio & Blair 1997). For both genes, we used 2 µL of DNA, 12.5 µL of HotStarTaq Master Mix (a solution which provides a final concentration of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 200 µM each deoxynucleoside triphosphate; Qiagen), 2 µL of each primer (2 µM) and 25 µL QSP of distilled water.

The PCR amplification procedure consisted of 15 min activation of the HotStartTaq DNA polymerase at 95°C, 35 cycles including 30 s initial denaturation at 95°C, 1 min annealing at 50°C, and 1 min extension at 72°C, followed by 10 min of final extension at 72°C.

DNA sequencing was performed by Eurofins MWG Operon (Edersberg, Germany) using PCR-amplified products as templates. We therefore obtained 81 sequences of 16S but due to technical issues only 79 sequences of COI could be sequenced. In addition, we downloaded nine available 16S and COI sequences from Genbank for further analyses (see Table 2 for exact locations and Genbank accession numbers)

#### *Haplotype variability, sequence alignment and phylogenetic analysis*

The number of haplotypes ( $H_{ap}$ ), the haplotype diversity (H) and the nucleotide diversity ( $\pi_h$ ) of mtDNA were calculated using DnaSp V5 (Librado & Rozas 2009).

mtDNA sequences were aligned using webPRANK (Löytynoja & Goldman 2010). For each method of tree reconstruction we performed separated analyses for the two gene fragments (COI and 16S). Then, these two gene fragments were concatenated into a single supermatrix 1026 bp long. We used a total of 68 sequences in the supermatrix concatenation (Table 3). Since

we did not obtain nucleotide sequences of both genes from the same individual in the sequences retrieved from Genbank, we used them separately in gene analyses.

Two different approaches of phylogenetic tree reconstruction, Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI), were used. ML analyses were conducted using the best-fitting model of sequence evolution. Model selection was based on Akaike's information criterion (AIC) using Mega6 (Tamura *et al.* 2013). The program ran 5000 bootstrap replications (Table 3). BI analyses were performed with MrBayes software v3.2 (Ronquist *et al.* 2011). The tree space was explored using Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analyses with random starting trees, four simultaneous, sequentially heated independent chains sampled every 500 trees during five million generations. Suboptimal trees were discarded once the “burn-in” phase was identified and a majority-rule consensus tree, with posterior probability support of nodes (PP), was constructed with the remaining trees.

## RESULTS

### ***Genetic variability at nuclear microsatellite loci***

The number of alleles per locus varied between three and 14 (mean  $9.875 \pm 3.350$  SE) over all populations. The average gene diversity ( $H_s$ ) was  $0.084 \pm 0.009$  (SE) and the observed heterozygosity ( $H_o$ ) was  $0.050 \pm 0.004$  (SE) (Table 4). Overall loci and populations, *P. columella* displayed significant departures from HWE ( $P = 0.002$ ). Indeed, most genotyped individuals proved to be homozygous at the eight microsatellite loci (1216 individuals, 80.6%). Consequently, the estimated selfing rate overall populations was high ( $0.810 \pm 0.027$  SE; Table 4), consistent with previous results (Nicot *et al.* 2008). At the exception of one pair of loci

(PCO6 and PCO20), the linkage disequilibrium was highly significant for all pairs of loci ( $P < 0.001$ ). In addition, the genetic differentiation among populations was strong and highly significant ( $F_{st} = 0.907 \pm 0.010$  SE). No isolation by distance was detected at the whole studied scale (Mantel test,  $P = 0.944$ ).

Significant difference in allelic richness and gene diversity was detected between USA and all other populations ( $P < 0.004$ ) and a marginal difference was detected between USA and Colombian populations ( $P = 0.063$ ). All other pairs of populations did not show significant differences ( $P > 0.10$ ).

### ***Bayesian cluster analysis and microsatellite network***

We further investigated the genetic structure of *P. columella* using three different approaches: (1) DAPC, (2) Bayesian clustering and (3) NJ distance network. These three approaches returned largely consistent results (Figs. 1 and 2).

DAPC suggested the existence of 13 genetically distinct clusters and InStruct 17 clusters (Fig. 1, individual cluster assignment probability matrix available upon request). Some clusters were always associated if we decreased the number of K and could be considered belonging to one group (Fig. 1, from K=9 to K=17). At K=9, the clustering recovered nine major groups: (1) one group with all populations from La Reunion Island, Peru, Mayotte, French Polynesia, Madagascar, South Africa, Venezuela, Guadeloupe, some susceptible populations from Cuba and three populations from Colombia (cluster 1); (2) a second group with only one population from North USA (cluster 8); (3) one group with Cuban populations resistant to the infection by *F. hepatica* (cluster 5); (4) another distinct group with some Cuban populations susceptible to infection by the liver fluke (cluster 6); (5) one group with most populations from Colombia

(cluster 7); (6) another group with populations from Argentina and Paraguay (cluster 3) and (7-9) three distinct clusters grouping different North American populations (Campus Lake, LA in cluster 2; Bennedale, MS, Franklinton, LA and Willow, TX in cluster 4; all populations from Florida in cluster 9). The French population belonged to the same cluster than Campus Lake (cluster 2). At K=13, the clustering pattern was not informative except for the North American populations. Individuals from Campus Lake, LA, Bennedale, MS and Florida still grouped in clusters 2, 4 and 7, respectively, but individuals from Franklinton, LA and Willow, TX were separated from other individuals in a distinct cluster (cluster 6). At K=17, the clustering pattern was not informative.

The genetic distance network (Fig. 2) suggested the existence of eight genetically distinct clusters of populations: cluster 1 was represented by the population from Pennsylvania alone (North USA); cluster 2 included all populations from Argentina and Paraguay; cluster 3 contained populations from Florida (South USA); cluster 4 contained the five populations resistant to *F. hepatica* from Cuba; cluster 5 grouped the French population, sensitive populations from Cuba and three populations from USA (LA, MS and TX); cluster 6 contained worldwide distributed populations (Cuba, Venezuela, Guadeloupe, South Africa, Madagascar, Mayotte, French Polynesia, Peru, La Reunion Island and Colombia); cluster 7 contained one sensitive population from Cuba; and cluster 8 gathered most Colombian populations.

Summing up, most populations sampled in distant countries/continents grouped in a single worldwide cluster. In contrast, populations from USA were genetically diverse and grouped in three different genetic clusters. Also, resistant populations to the infection by the liver fluke gathered together in a distinct cluster.

### ***Phylogenetic analysis and mitochondrial diversity***

#### *Haplotype diversity*

The comparison of mitochondrial 16S sequences revealed a total of 10 haplotypes (mean number of haplotypes per site:  $H = 0.652 \pm 0.049$  SD) determined by 20 polymorphic sites without indels (Table 5.A). Consistently, COI sequences revealed the existence of 12 haplotypes (mean number of haplotype per site:  $H = 0.692 \pm 0.045$  SD) determined by 49 polymorphic sites without indels (Table 5.B). For both markers, North American populations had the highest number of mitochondrial haplotypes ( $N_h = 6$ , average per haplotype:  $H = 0.890 \pm 0.055$  SD for 16S;  $N = 8$ , mean:  $H = 0.902 \pm 0.050$  SD for COI) followed by Cuba ( $N_h = 3$  for 16S;  $N_h = 2$  for COI) and Colombia ( $N_h = 2$  for 16S;  $N_h = 2$  for COI), whereas a unique mitochondrial haplotype was detected in populations from South Africa, Egypt, Mayotte, Peru, Venezuela, La Reunion Island, France and in three Colombian populations. Interestingly, the most widely distributed haplotypes for both 16S and COI genes (respectively haplotypes F and I) were also found in two North American populations (Franklin and Campus Lake; Table S2). Populations from Argentina and Paraguay shared a unique haplotype in both 16S and COI. Finally, all Cuban populations that were experimentally resistant to the infection by *F. hepatica* shared a common haplotype too (haplotypes I for 16S and L for COI; Table 5 and table S2).

#### *Phylogenetic analysis: population structure and phylogeography*

The best model describing the evolution of the concatenated supermatrix was TN92 + G. The ML and BI majority rule consensus trees resulted in similar general tree topology with high branch supports for almost all nodes (Fig. 3 and Fig. S1).

According to the ML tree (Fig. 3), populations grouped in 10 major clades with high branch supports (70 to 100%). The first two clades contained individuals from northern USA and Colombia, respectively (clades 1 and 2). Then, divergence of populations from Argentina and Paraguay is distinguishable (clade 3), followed by divergence of Cuban populations, either resistant (clade 4) or susceptible (clade 5) to the infection by *F. hepatica*. Then four different clades containing southern USA individuals were distinguishable (clades 6-9). The last clade gathered individuals from the remaining populations distributed worldwide (clade 10). Trees based on individual genes gave similar topologies (Fig. S3 in Supplementary Material). Interestingly, in the COI tree, sequences retrieved from Genbank from Australia, Egypt and USA Alabama (Remigio & Blair 1997; Remigio & Hebert 2003; Grabner *et al.* 2014) grouped within the worldwide group (clade 10); one sequence from Argentina (Standley *et al.* 2013) grouped within the Argentinean/Paraguayan clade 3 and a sequence from USA Michigan clustered apart (Fig. S3).

## DISCUSSION

### ***Genetic diversity and population structure of P. columella***

We studied the genetic diversity of *P. columella* at a global scale by comparing invaded and native populations with the aid of fast evolving, nuclear markers as well as mitochondrial markers evolving at a slower pace. Our analyses indicated that this species had extremely low genetic diversity (63 out of 80 populations showed very low genetic variation, with 0 to 2 polymorphic loci per population, and mean  $H_s < 0.1$ ; only two populations from USA and Colombia had  $H_s > 0.2$ ); high  $F_{is}$  within populations (mean  $F_{is} = 0.811$ ), consistent with its self-

fertilizing mating system (Nicot *et al.* 2008); strong genotypic disequilibrium; and high population structure, as evidenced by high  $F_{st}$  values, consistent with strong extinction-colonization dynamics. Concerning the mating system, the lack of within-population genetic diversity (mostly one allele per locus per population) made difficult to distinguish selfing from mating among relatives; however, we could use the corrected selfing estimator for 14 populations where we found some genetic variation and heterozygotes and found that selfing rate estimates were close to one, to the notable exceptions of populations from USA where selfing rates varied between 0.099 and 0.875 (median = 0.675; Table 4).

Low genetic variability has been found in other invasive snail species. The prosobranchs *Melanoides tuberculata* and *Potamopyrgus antipodarum* (Lively 1987; Samadi *et al.* 1999), which are able to do asexual reproduction, and the pulmonates *Galba truncatula* and *Biomphalaria pfeifferi* (Kopp *et al.* 2012; Mintsa Nguema *et al.* 2013) were shown to harbour very low genetic variation in the invaded areas. Likewise, the pulmonate *Bulinus truncatus* showed depletion of heterozygous genotypes in Cameroonian populations, probably due to high self-fertilization (Djuikwo-Teukeng *et al.* 2011). However, gene diversities in *P. columella* were lower than in other selfing snails, pointing to an additional cause of gene diversity loss, likely strong bottlenecks, as previously showed in *G. truncatula* (Meunier *et al.* 2001 ; Meunier *et al.* 2004).

Concerning the among-population differentiation, we found high  $F_{st}$  estimates in *P. columella*, with many populations (and even whole geographic regions) exhibiting a unique fixed genotype. Populations from the same country were not differentiated at the exception of USA populations, where populations were highly structured ( $F_{st}$ : 0.598-0.841).

No evidence of isolation by distance was found at the whole studied scale, suggesting a migration-drift dynamic.

All in all, our results strongly suggest that *P. columella* is a self-fertilizing species that exhibits a considerable colonization dynamics and strong bottlenecks. This is consistent with introduction ways for freshwater snails which are known to occur through random events such as flooding, dissemination by aquatic birds, or human activities (*e.g.* freshwater aquarium trade, Duggan 2010).

### ***Invasion pattern and demographic history over the distribution range***

#### *One successful worldwide invader: a clonal population*

In invasion biology it is commonly admitted that introduced populations had depleted genetic variation probably due to bottlenecks and founding events. Thus, invasive populations are expected to be less genetically diverse than native populations while they persist and adapt in new environment (Cristescu 2015). This loss of genetic variation of the invader and the success of invasion constitute a “genetic paradox” in the study of biological invasions (Roman & Darling 2007).

Some non-exclusive explanations have been put forward to the invasiveness of genetically depleted populations. One of them considers the mating system of the invader species. If it reproduces through self-fertilization, as it seems to be the case of *P. columella*, the genetic load could be purged, diminishing the frequency of recessive deleterious alleles and thus inbreeding depression (Crnokrak & Barrett 2002). Our results demonstrate a strong decrease of genetic diversity in invasive populations. Both nuclear and mitochondrial genetic markers showed that invasive populations are basically clones probably due to founding events mixed with self-fertilization. These populations came from geographic regions as distant as Peru, Colombia,

Venezuela, South Africa, Madagascar, Mayotte, La Reunion Island and French Polynesia, and all belong to a unique clade or group in the microsatellite network, Bayesian clustering analysis or mitochondrial trees. In the ML (Fig. 3) and in the Bayesian (Fig. S1) trees, we could see that this worldwide clade is more recent than all other populations. The sudden worldwide invasion of *P. columella* has probably been initiated by this genotype/haplotype. Similar patterns have been found on other freshwater snails such as *G. truncatula* in the Bolivian altiplano (Meunier *et al.* 2001) or *B. pfeifferi* in Madagascar (Charbonnel *et al.* 2002).

Successful invasions initiated by very few individuals are a perfect illustration of the genetic paradox: how can a population depleted in its genetic variability succeed and invade a broad range of geographic regions? Bock *et al.* (2014) reviewed several processes increasing invasiveness like pre-introduction adaptation and post-introduction adaptation of phenotypic plasticity. These processes have not been tested in *P. columella* and the phenomenon underlying its successful clonal invasion remains unclear.

#### *Demographic history over the distribution range*

Several lines of evidence suggested that *P. columella* had a North American origin: (1) the species was described for the first time in USA in 1817 (Table S1); (2) at least half of the extant diversity of Lymnaeidae took its origin in North America (Correa *et al.* 2010); (3) a previous phylogenetic study of the Lymnaeidae grouped this species within an American clade (Correa *et al.* 2010); however, the tree branch sustaining this hypothesis was weakly supported. Additional sampling and more robust genetic analyses were needed to confirm or reject such a hypothesis. Following the founder effect theory, we expect higher genetic diversity in native populations than in introduced populations. Our results here showed that the populations of *P.*

*columella* from the USA exhibited the highest genetic diversity in terms of allelic richness and gene diversity for both nuclear microsatellites and mtDNA. Altogether, the results showed here and previous phylogenetic evidence strongly argue for a North American origin of *P. columella*.

After the first records of *P. columella* in North America, the species was recorded successively in Cuba and then in different South American countries, before its recent records in the Old World (See Table S1). According to our analyses, populations from Peru, Ecuador and Venezuela were all founded by the worldwide invasive genotype/haplotype. However, not all South American populations were depleted of genetic variation or invaded by the same clone. We found a higher number of haplotypes in Cuba and Colombia, and a different genetic pattern in Argentina/Paraguay, which demonstrates that several independent introductions have occurred within South America and the Caribbean. Cuban populations seemed to be genetically close to populations from USA according to ML and BI trees, suggesting a first introduction from this region. The worldwide haplotype was found in Cuba and Colombia too, suggesting a second independent introduction, probably from South USA, where the worldwide haplotype was also found. Populations from Argentina and Paraguay had low level of genetic diversity but they were completely distinct from all other populations. We found in these two countries a unique haplotype for both genes and barely a unique genotype. However, these populations were relatively close geographically (133 km). These results suggest a single introduction, probably from northern South America, according to the two phylogenetic trees. Colombian and Argentinean haplotypes were not found in the USA probably due to poor sampling.

### *Origin and pathways of invasion*

Concerning the origin of invasion, according to the mitochondrial tree, we saw that one population from Louisiana in USA belonged to the clade 10 (worldwide haplotype). Moreover, the clade 9 (Texas, USA) was genetically close to the worldwide haplotype. This could be a clue in favour of a North American origin of the invasive worldwide haplotype. Another hypothesis could be a widespread secondary invasion initiated by a bridgehead population which not came from the native area (e.g., Colombia or Cuba). This process, called the “invasive bridgehead effect” (Estoup & Guillemaud 2010; Lombaert *et al.* 2010) has been demonstrated on the Harlequin ladybeetle (*Harmonia axyridis*), whose native area is in Asia but has invaded Europe from a North American population acting as a bridgehead population (Lombaert *et al.* 2010). Our data did not permit to conclude on the origin of the invasive population, because (1) our sampling in North America (the supposed origin area) remains limited and (2) we were not able to use Approximate Bayesian Computation (Beaumont *et al.* 2002) which is the only way to test invasion scenarios and infer a convincing demonstration by considering the stochasticity of the genetic and demographic history of the considered species (Estoup & Guillemaud 2010).

### ***Pseudosuccinea columella and the consequences for fasciolosis transmission***

#### *Genetic differentiation between resistant and susceptible populations*

Previous studies demonstrated that some Cuban populations, experimentally proven to be resistant to the infection by the liver fluke, were genetically different from susceptible populations on the basis of RAPD markers (Fernandez-Calienes *et al.* 2004). Using more reliable genetic markers (microsatellites and mtDNA sequences), we confirmed that resistant

populations Babinay (LBB), Puente (LCP), El Azufre (LCE and LCR), and La Coca (LCCA) were genetically different from all other susceptible populations of *P. columella* and constituted a separate group in DPCA analysis, the NJ network, Instruct clustering and ML and BI trees. Detailed analysis of microsatellite data showed that these populations were distinct at three out of eight studied loci, with allele frequencies not observed in other populations. (1) Among the twelve alleles detected at the PCO1 locus overall populations, two of them were found in high frequency in resistant populations (allele 229: fixed in populations LCCA and LCR; allele 237: fixed in populations LBB, LCE and LCP; this allele was also found in the susceptible Cuban population LCC at frequency = 0.03 and fixed in the USA population SJ). Except in population LCC and SJ, these two alleles were not found in any other population. (2) Among the ten alleles found at locus PCO12, one of them (allele 160) was fixed in all resistant populations and also found in the USA population SJ at frequency = 0.38. At the mitochondrial level, the resistant Cuban populations constituted a unique haplotype for both genes (COI and 16S). Together, mitochondrial and microsatellite results suggest that the acquisition of parasite resistance could be recent. Perhaps, a unique ancestral individual acquired resistance to the parasite and then dispersed to additional sites in Cuba. With these results we cannot say yet if resistance to *F. hepatica* took its origin genetically, or if it was due to phenotypic plasticity, or to an epigenetic phenomenon. Nonetheless, our results clearly showed that resistant individuals displayed a unique and distinct genetic pattern.

The genetic differentiation of resistant populations of *P. columella* further compels the search for genes conferring resistance to the parasite. However, because of the low effective recombination rate in *P. columella*, these genes would be in linkage disequilibrium with the rest of the genome. Therefore, determining candidate genes would virtually require sequencing the entire genome of *P. columella*. Identifying genes of resistance to *F. hepatica* would nonetheless

warrant the effort, particularly in this age of rapid whole genome sequence acquisition, as it would constitute a breakthrough in our understanding of the Lymnaeidae-*Fasciola* host-parasite interaction (e.g., determining when and where resistance takes place and which physiologic functions are involved in the snail). It would also be a promising way to control the expansion of fasciolosis (e.g., introducing resistant genotypes into regions with high prevalence of the disease or genetically modifying the intermediate hosts). In any case, this study illustrates how population genetics can give insight into the host-parasite interaction and in epidemiological surveys.

#### *Clone invasion as a health threat*

We demonstrated that invasive populations of *P. columella* are accompanied by strong reductions in the levels of genetic variation. In epidemiological terms, it is commonly admitted that genetically homogenous host populations are more vulnerable to infection than genetically diverse populations (King & Lively 2012). This idea came from empirical studies in agricultural fields where disease epidemics have devastated agricultural monocultures (Zhu *et al.* 2000; Pilet *et al.* 2006). The “monocultures effect” has also been observed in animal host organisms. Indeed, (Altermatt & Ebert 2008) showed that the microsporidian parasite spread better in genetically depleted *Daphnia magna* populations. Another field study showed that the rapid expansion of *Biomphalaria pfeifferi*, an intermediate host for human schistosomiasis, was followed by the establishment of genetically homogenous snail populations in Zimbabwe that were more susceptible to the parasite, promoting the resurgence of human schistosomiasis (Campbell *et al.*, 2010). Several studies on the partially selfing fish (*Kryptolebias marmoratus*) showed that outcrossing populations which had higher genetic diversity were less susceptible to parasites, an argument favouring sex maintenance in this species (Ellison *et al.* 2011).

On our biological system, passage into the intermediate snail host, where asexual multiplication takes place, is one of the most critical points of the life cycle of trematodes. As the most invasive populations of *P. columella* have no genetic variability to evolve resistance mechanisms, the parasite can freely expand without opposition. Moreover, we added sequences from Genbank on our phylogenetic analyses and found that one sequence from Egypt (Grabner *et al.* 2014) belonged to the worldwide haplotype (Fig. S2). (Grabner *et al.* 2014) pointed *P. columella* as an important vector of fasciolosis in Egypt and showed that this snail could be the cause of the important increase of the disease in this country. To our knowledge, it is the first study outside the American continent that emphasizes this species as a good invader thanks to its domination in the snail community and as an efficient intermediate host. Knowing that snails in other countries are genetically similar to this Egyptian individual, we would expect an increase of fasciolosis cases everywhere this haplotype has established.

To conclude, this study illustrates how population genetics can give insight at the interface between biological invasion and host-parasite interaction.

## REFERENCES

- Altermatt F, Ebert D (2008) Genetic diversity of *Daphnia magna* populations enhances resistance to parasites. *Ecology Letters*, **11**, 918–928.
- Appleton CC (2003) Alien and invasive fresh water Gastropoda in South Africa. *African Journal of Aquatic Science*, **28**, 69–81.
- Beaumont M a., Zhang W, Balding DJ (2002) Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, **162**, 2025–2035.
- Bock DG, Caseys C, Cousens RD *et al.* (2014) What we still don't know about invasion genetics. *Molecular Ecology*, n/a–n/a.
- Boray J, Fraser G, Williams J, Wilson J (1985) The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on gazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. *Australian Veterinary Journal*, **62**, 4–6.
- Bousset L, Pointier JP, David P, Jarne P (2014) Neither variation loss, nor change in selfing rate is associated with the worldwide invasion of *Physa acuta* from its native North America. *Biological Invasions*, **16**, 1769–1783.
- Brookes V, Hernández-Jover M, Black P, Ward M (2014) Preparedness for emerging infectious diseases: pathways from anticipation to action. *Epidemiology and Infection*, 1–16.
- Brown D (1994) *Freshwater snails of Africa and their medical importance* (Taylor, Francis, Eds.). London, U.K.
- Charbonnel N, Angers B, Rasatavonjizay R *et al.* (2002) The influence of mating system, demography, parasites and colonization on the population structure of *Biomphalaria pfeifferi* in Madagascar. *Molecular Ecology*, **11**, 2213–2228.
- Cohen ML (2000) Changing patterns of infectious disease. *Nature*, **406**, 762–767.
- Correa AC, Escobar JS, Durand P *et al.* (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC evolutionary biology*, **10**, 381.
- Cristescu ME (2015) Genetic reconstructions of invasion history. *Molecular Ecology*, n/a–n/a.

- Crnokrak P, Barrett SCH (2002) Perspective: purging the genetic load: a review of the experimental evidence. *Evolution; international journal of organic evolution*, **56**, 2347–2358.
- David P, Pujol B, Viard F, Castella V, Goudet J (2007) Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, **16**, 2474–2487.
- Djuikwo-Teukeng FF, Njiokou F, Nkengazong L *et al.* (2011) Strong genetic structure in Cameroonian populations of *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae), intermediate host of *Schistosoma haematobium*. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 17–22.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: Genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, **17**, 431–449.
- Duggan IC (2010) The freshwater aquarium trade as a vector for incidental invertebrate fauna. *Biological Invasions*, **12**, 3757–3770.
- Dunn AM, Hatcher MJ (2015) Parasites and biological invasions: parallels, interactions, and control. *Trends in Parasitology*, 1–11.
- Ellison A, Cable J, Consuegra S (2011) Best of both worlds? association between outcrossing and parasite loads in a selfing fish. *Evolution*, **65**, 3021–3026.
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: Why, how and so what? *Molecular Ecology*, **19**, 4113–4130.
- Fernandez-Calienes A, Fraga J, Pointier J-P *et al.* (2004) Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta tropica*, **92**, 83–7.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, **3**, 294–9.
- Gao H, Williamson S, Bustamante CD (2007) A Markov chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. *Genetics*, **176**, 1635–51.

- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J. Hered.*, **86**, 485–486.
- Goudet J (2003) Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from: <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html> Updated from Goudet (1995).
- Goudet J, Raymond M, de Meeüs T, Rousset F (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, **144**, 1933–40.
- Grabner DS, Mohamed F a MM, Nachev M *et al.* (2014) Invasion Biology Meets Parasitology: A Case Study of Parasite Spill-Back with Egyptian *Fasciola gigantica* in the Invasive Snail *Pseudosuccinea columella*. *PloS one*, **9**, e88537.
- Gutiérrez A, Pointier J-P, Fraga J *et al.* (2003) *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Experimental parasitology*, **105**, 211–8.
- Harry HW, Hubendick B (1964) The freshwater pulmonate mollusca of Puerto Rico. , **9**.
- Hartl D, Clark H (1997) Principles of population genetics. *Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA*.
- Hatcher MJ, Dick JT a., Dunn AM (2012) Disease emergence and invasions (S Perkins, Ed.). *Functional Ecology*, **26**, 1275–1287.
- Hulme PE (2014) Invasive species challenge the global response to emerging diseases. *Trends in parasitology*, **30**, 267–70.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, **23**, 254–67.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC genetics*, **6**, 13.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*, **11**, 94.
- Jones KE, Patel NG, Levy M a *et al.* (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, **451**, 990–3.

- King KC, Lively CM (2012) Does genetic diversity limit disease spread in natural host populations? *Heredity*, **109**, 199–203.
- De Kock KN, Wolmarans CT (2008) Invasive alien freshwater snail species in the Kruger National Park, South Africa. *Koedoe*, **50**, 49–53.
- Kolbe JJ, Glor RE, Rodríguez Schettino L *et al.* (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, **431**, 177–81.
- Kopp KC, Wolff K, Jokela J (2012) Natural range expansion and human-assisted introduction leave different genetic signatures in a hermaphroditic freshwater snail. *Evolutionary Ecology*, **26**, 483–498.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **25**, 1451–2.
- Liu J, Dong M, Miao SL *et al.* (2006) Invasive alien plants in China: Role of clonality and geographical origin. *Biological Invasions*, **8**, 1461–1470.
- Lively CM (1987) Evidence from a New Zealand snail for the maintenance of sex by parasitism. *Nature*, **328**, 519–521.
- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet JM *et al.* (2010) Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE*, **5**.
- Löytynoja A, Goldman N (2010) webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. *BMC bioinformatics*, **11**, 579.
- Madsen H, Frandsen F (1989) The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, **46**, 139–146.
- Malek EA, Chrosciechowski P (1964) Lymnaea (Pseudosuccinea) columella from Venezuela, and notes on distribution of Pseudosuccinea. *Nautilus*, **78**, 54–56.
- Malek EA, Cogswell FB (1980) Lymnaea (Pseudosuccinea) columella in Colombia. *Nautilus*, **94**, 112–114.
- Mas-Coma S (2005) Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology*, **79**, 207–216.

- Mas-Coma S, Anglés R, Esteban JG *et al.* (1999) The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, **4**, 454–67.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero M a (2005) Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International journal for parasitology*, **35**, 1255–78.
- Mergeay J, Verschuren D, De Meester L (2006) Invasion of an asexual American water flea clone throughout Africa and rapid displacement of a native sibling species. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **273**, 2839–2844.
- Meunier C, Hurtrez-Bousses S, Durand P, Rondelaud D, Renaud F (2004a) Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular ecology*, **13**, 2535–43.
- Meunier C, Hurtrez-Bousses S, Durand P, Rondelaud D, Renaud F (2004b) Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular ecology*, **13**, 2535–43.
- Meunier C, Hurtrez-Boussès S, Jabbour-Zahab R *et al.* (2004) Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity*, **92**, 316–22.
- Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S *et al.* (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular ecology*, **10**, 1333–40.
- Mintsa Nguema R, Langand J, Galinier R *et al.* (2013) Genetic diversity, fixation and differentiation of the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi* (Gastropoda, Planorbidae) in arid lands. *Genetica*, **141**, 171–184.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 3321–3.
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, **41**, 225–233.
- Nicot A, Dubois M-P, Debain C, David P, Jarne P (2008) Characterization of 15 microsatellite loci in the pulmonate snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Molecular ecology resources*, **8**, 1281–4.

- Oliveira SM, Fujii TU, SpositoFilha E, Martins AMCRPF (2002) Ocorrência De Lymnaea Columella Say , 1817 Infectada naturalmente por Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) No Vale Do Ribeira , São Paulo , Brasil. *Arq. Inst. Biol., Sao Paulo*, **69**, 29–37.
- Paraense WL (1983) Lymnaea columella in northern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **78**, 477–482.
- Pilet F, Chacón G, Forbes G a, Andrivon D (2006) Protection of susceptible potato cultivars against late blight in mixtures increases with decreasing disease pressure. *Phytopathology*, **96**, 777–783.
- Pointier JP, Marquet G (1990) Taxonomy and distribution of freshwater mollusks of French Polynesia. *Venus*, **49**, 215–231.
- Prepelitchi L, Petrokovsky S, Kleiman F *et al.* (2011) Population Structure and Dynamics of Lymnaea columella (Say, 1817) (Gastropoda : Lymnaeidae) in Wetlands of Northeastern Argentina. *Zoological studies*, **50**, 164–176.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–59.
- Remigio E a., Blair D (1997) Molecular Systematics of the Freshwater Snail Family Lymnaeidae (Pulmonata: Basommatophora) Utilising Mitochondrial Ribosomal Dna Sequences. *Journal of Molluscan Studies*, **63**, 173–185.
- Remigio E, Hebert PDN (2003) Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 641–647.
- Ren MX, Zhang QG, Zhang DY (2005) Random amplified polymorphic {DNA} markers reveal low genetic variation and~a~single dominant genotype in~\textit{Eichhornia crassipes} populations throughout {China}. *Weed Research*, **45**, 236–244.
- Roman J, Darling J a (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in ecology & evolution*, **22**, 454–64.
- Ronquist F, Huelsenbeck J, Teslenko M (2011) Draft MrBayes version 3 . 2 Manual : Tutorials and Model Summaries.

- Samadi S, Mavárez J, Pointier JP, Delay B, Jarne P (1999) Microsatellite and morphological analysis of population structure in the parthenogenetic freshwater snail *Melanoides tuberculata*: Insights into the creation of clonal variability. *Molecular Ecology*, **8**, 1141–1153.
- Scott M (1953) Sobre Lymnaeidae argentinos. *Physis*, **20**, 401–408.
- Standley CJ, Prepelitchi L, Pietrokovsky SM *et al.* (2013) Molecular characterization of cryptic and sympatric lymnaeid species from the Galba/Fossaria group in Mendoza Province, Northern Patagonia, Argentina. *Parasites & vectors*, **6**, 304.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, **30**, 2725–9.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S (2005) Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging infectious diseases*, **11**, 1842–7.
- Woolhouse MEJ, Haydon DT, Antia R (2005) Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in ecology & evolution*, **20**, 238–44.
- Wright S (1965) The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Society for the Study of Evolution*, **19**, 395–420.
- Wu Y, Molongoski JJ, Winograd DF *et al.* (2015) Genetic structure, admixture and invasion success in a Holarctic defoliator, the gypsy moth (*Lymantria dispar*, Lepidoptera: Erebidae). *Molecular Ecology*, **24**, 1275–1291.
- Zhu Y, Zhu Y, Chen H *et al.* (2000) Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*, **406**, 718–22.

### ***Acknowledgements***

Part of this work has been supported by University Montpellier 2 (“contrat doctoral” fellowship to ML), by IRD (financial support, grant BSTD to AC and grant BEST to AAV) and by CNRS (financial support). We are most grateful to P. Alda, P. Durand, R. Gozlan and F. Renaud for helpful discussions and to Ananda Christophe for technical help.

### ***Data Accessibility***

Sequences data have been deposited in Genbank

### ***Authors' contributions***

ML and AC performed DNA extraction, molecular data, analysis and drafted the manuscript; AAV contributed to sampling and molecular biology analyses; AD and AN contributed to molecular experiment; PD and JPP participated in the design of the study and revised the manuscript; SHB coordinated the study, helped draft and revised the manuscript. All authors contributed to sample collection, read and approved the final manuscript.

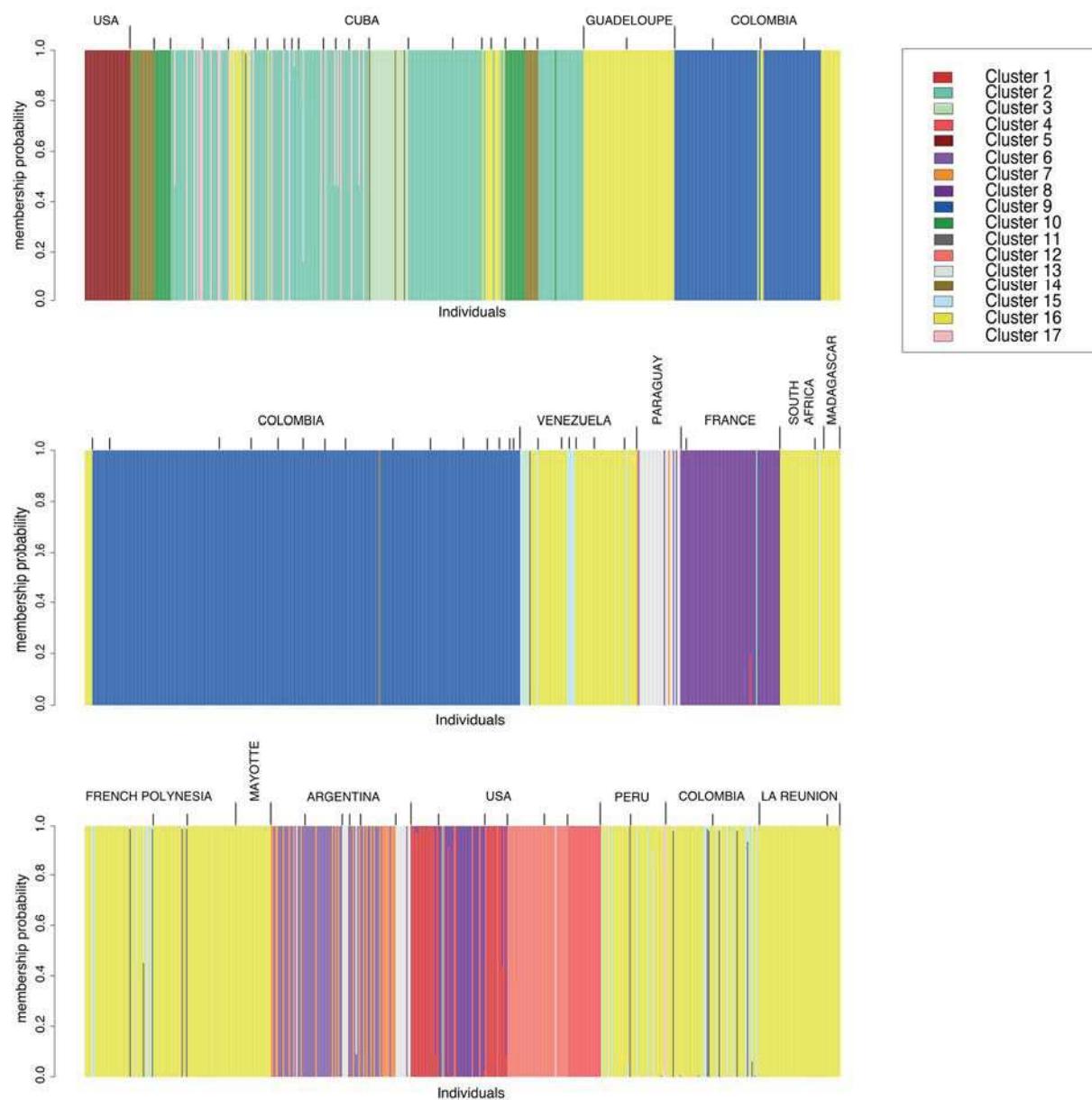
**Figure legends:**

**Figure 1: Population genetic structure for K=9, K=13 an K=17 inferred by Bayesian analysis and DAPC analysis.** The most likely number of cluster was K=17 following Instruct output and  $9 < K < 20$  following DAPC. Each vertical bar represents an individual and its assignment proportion into one of seventeen colored clusters (K). This figure was obtained with R studio, using the package *adegenet*.

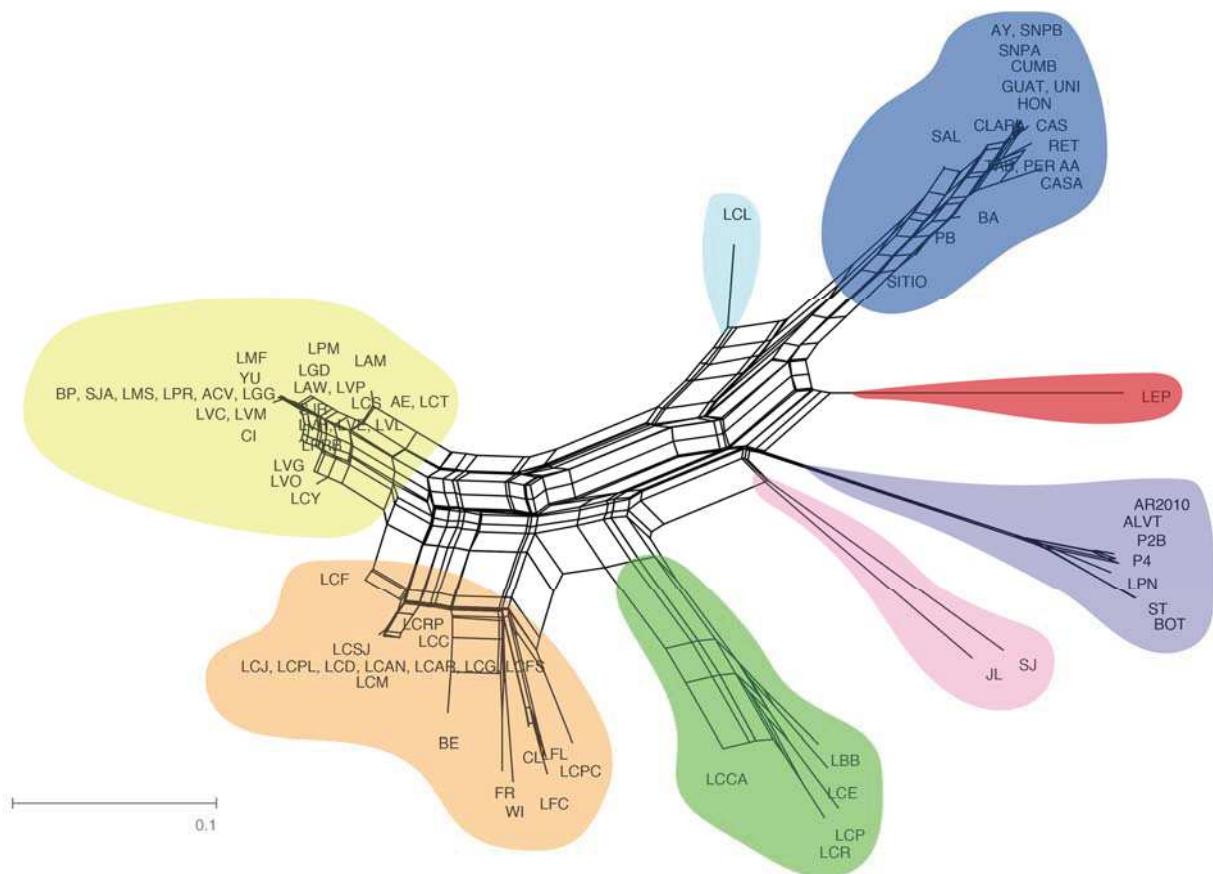
**Figure 2: Neighbour joining network inferred from microsatellite data using Nei and Li distances.** The eight different colours indicate the different population clusters. Each letter code refers to one population.

**Figure 3: Maximum likelihood tree of two concatenated genes, 16S and CO1, on 79 individuals of *Pseudosuccinea columella*.** A total of 10 clusters are represented by a specific colour and reported on the world map by a circle. Cluster 1 in red gather individuals from USA – Pennsylvania; Cluster 2 in blue group individuals from Colombia; Cluster 3 in purple group individuals from Argentina and Paraguay; Cluster 4 in light green gather 3 individuals from Cuba; Cluster 5 in green gather 2 individuals from Cuba which are resistant to infection by *Fasciola hepatica*; Cluster 6 in pink represented individuals from Texas in USA; Cluster 7 in brown gather individuals from south Florida; Cluster 8 in light pink gather individuals from Florida, Cluster 9 in Orange gather individuals from Mississippi in USA, and Cluster 10 in yellow gather individuals from Colombia, Cuba, Guadeloupe, Venezuela, Peru, French Polynesia, South Africa, Madagascar, Mayotte, La Reunion Island, France and USA.

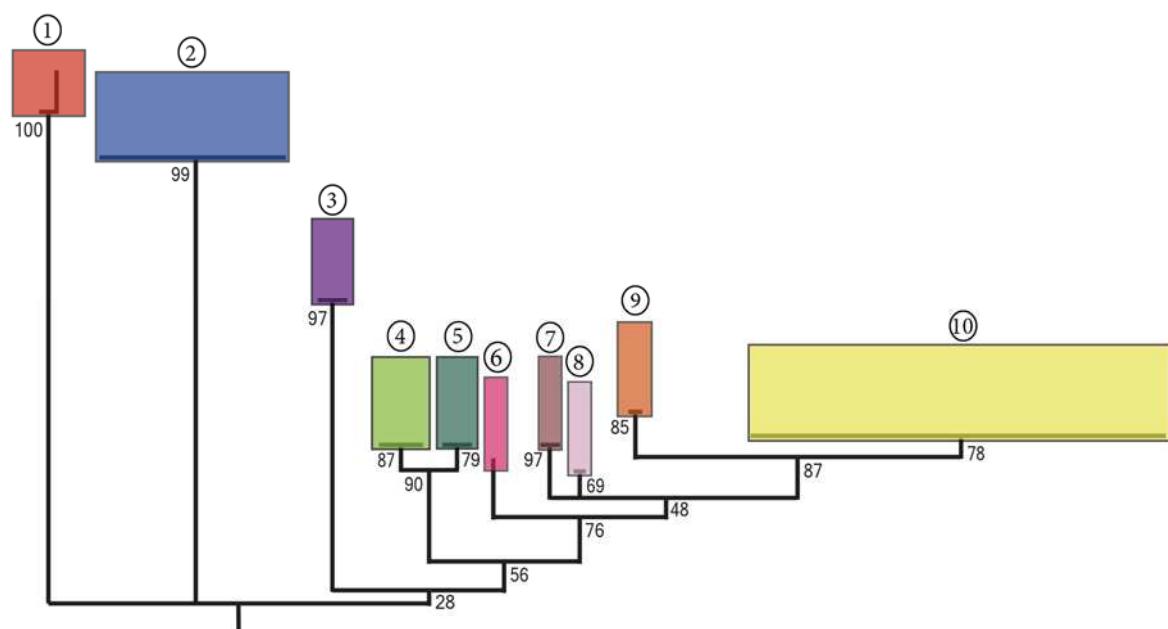
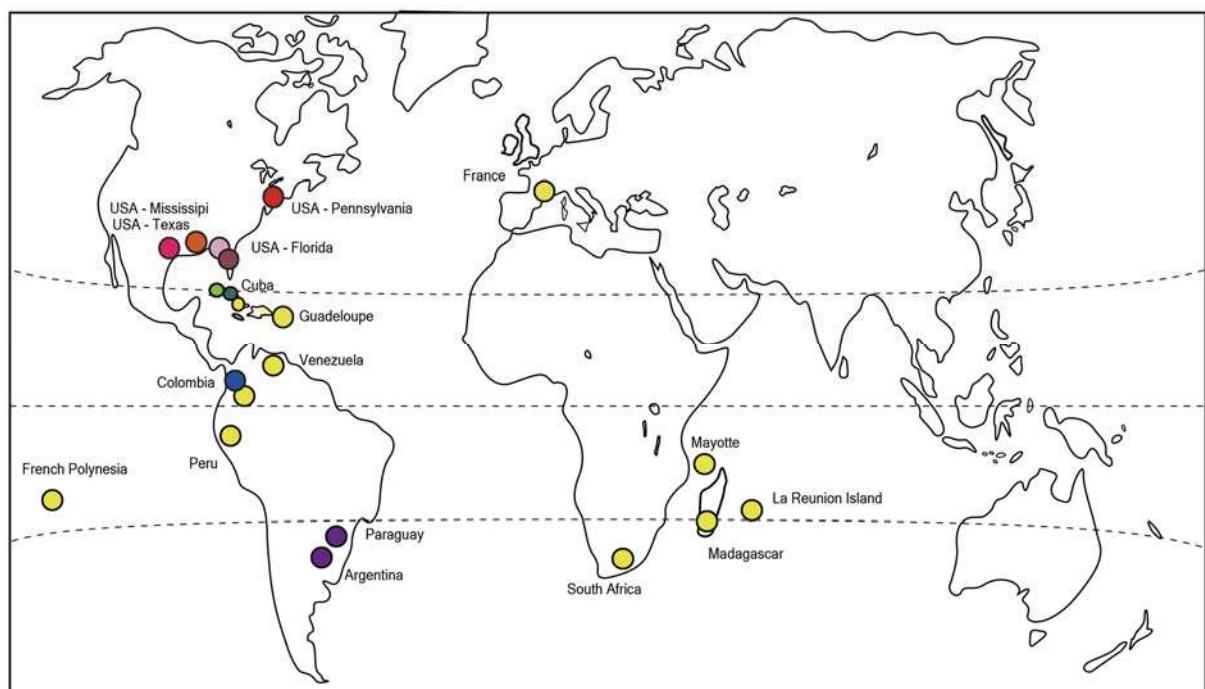
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



# Natural prevalence in Cuban populations of the lymnaeid snail *Galba cubensis* infected with the liver fluke *Fasciola hepatica*: small values do matter

Antonio A. Vázquez<sup>1,2</sup> · Jorge Sánchez<sup>2</sup> · Annia Alba<sup>2</sup> · Jean-Pierre Pointier<sup>3</sup> ·  
Sylvie Hurtrez-Boussès<sup>1,4</sup>

Received: 23 June 2015 / Accepted: 23 July 2015 / Published online: 8 August 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Natural infections of lymnaeid snails by *Fasciola hepatica* are of primary importance to study transmission. Also, infected snails in the field can be used to explore the existing compatibility in host–parasite interactions. This paper aimed to describe the infection rate of *Galba cubensis* populations in fasciolosis transmission areas. Eight sites were sampled in western Cuba and 24 infected snails at six sites were found. The mean prevalence was 2.94 % and the maximum value was 11.4 %. The intensity of parasite infection was assessed as the number of rediae inside a single snail. High variation within the sites examined was observed, but a maximum of 76 rediae was recovered from one individual. Although the presence of two other trematode families (Schistosomatidae and Paramphistomatidae) was discovered in dissected individuals, no co-infection with *F. hepatica* was observed. This is the first time a study of natural prevalence of *F. hepatica* infection is carried out in Cuba, considered a hyper endemic country for bovine fasciolosis. Our results suggest that fasciolosis transmission may occur even when the number of infected snails remains relatively low.

**Keywords** *Galba cubensis* · *Fasciola hepatica* · Natural infection · Parasite transmission

## Introduction

Natural infection of snails by trematode species is one of the most reviewed subjects by parasitologists and malacologists interested in the dynamics of infectious diseases transmitted by these intermediate hosts (Cichy et al. 2011). The study of parasite larvae infecting snails has revealed a huge diversity of helminths that can actually infect these hosts and enhanced the knowledge on diseases transmitted by molluscs (Żbikowska and Nowak 2009). The malacological surveillance of natural prevalences also gives insights into the higher and lower yearly infection levels and the identification of particular hosts for certain parasite species (Gürelly and Göçmen 2007; Mage et al. 2002).

One of the most important systems of trematodes infecting snails is that of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) and the freshwater snail family Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda). Fasciolosis is a worldwide parasitic infection ranging from tropical to subarctic regions (Hurtrez-Boussès et al. 2001; Mas-Coma et al. 2009) with increasing prevalence in human and domestic animal populations (WHO 2007). Transmission of this parasite is known to occur through a wide variety of lymnaeid species (Correa et al. 2010) but patterns of infection may differ according to the existing species and environmental conditions (Cruz-Mendoza et al. 2004). In the case of *F. hepatica* transmission, a study in central France has revealed an annual stability in the field infected main intermediate host *Galba truncatula* (Mage et al. 2002). However, a different study regarding the lymnaeid species *Omphiscola glabra* in the same region reported a slight increase in prevalence in

✉ Antonio A. Vázquez  
antonivp@ipk.sld.cu

<sup>1</sup> MIVEGEC, UMR IRD 224 CNRS 5290 UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

<sup>2</sup> Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Apartado Postal 601, Marianao 13, La Habana, Cuba

<sup>3</sup> USR 3278 CNRS-EPHE, Criobe Université de Perpignan, 66860 Perpignan, France

<sup>4</sup> Département de Biologie-Ecologie, (Faculté des Sciences)- cc 046-Université Montpellier, 4 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

a 6-year lapse, but directly dependant on habitat type (Dreyfuss et al. 2003; Correa et al. 2010). It is moreover interesting that these kinds of studies elsewhere have resulted in discovery of non-related snail species becoming infected with *F. hepatica*. The most relevant examples are the planorbid species *Bulinus truncatus*, with a prevalence of 39 % in northern Tunisia (Hamed et al. 2009) and 73.9 % infected individuals of the land snail *Omalonyx matheroni* (Succineidae) in Ireland (Reff et al. 2009).

In Cuba, fasciolosis is recognized as a true veterinary problem, with human outbreaks also (Rojas et al. 2010). The only two known lymnaeid species are *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*, both have experimentally been confirmed to transmit *F. hepatica*, and the former is considered the main intermediate host (Gutiérrez et al. 2011; Vázquez et al. 2014). However, although populations of *G. cubensis* have been found in sites with fascioliasis outbreaks in Cuba (Ferrer et al. 1985), their infection rates have not been investigated. Here, we present the first report of natural infections of *G. cubensis* by *F. hepatica* in Cuba. Relationships of natural prevalence values with fasciolosis transmission risk are also discussed.

## Material and methods

Sampling of *G. cubensis* was carried out in western Cuba considering that this region has been heavily affected by human fasciolosis (Rojas et al. 2010). A total of 816 adult snails were collected from eight sites corresponding to the surroundings of cowsheds and being informed as fascioliasis areas by the local veterinary authorities (Table 1). In each site, *G. cubensis* was the only lymnaeid snail recorded. Sampling was made directly by hand using soft forceps and the snails were immediately placed in small containers with water soaked filter paper to ensure vitality. All samples were taken between January and March 2013 during the dry season. Collected snails were carried live to the laboratory of malacology at the Institute of Tropical Medicine in Havana for species identification and infection confirmation. Definitive bovine host species observed in situ were cows (*Bos taurus*) and the water buffalo (*Bubalus bubalis*). Individuals of both species are known to freely move around the studied localities. All sampled sites are known to display definitive host infection rates above 70 % (Vázquez et al. unpublished data).

All collected individuals were dissected utilizing a stereomicroscope to observe the potential infection by trematode larvae (rediae and cercariae). The number of observed rediae was counted in order to determine the intensity of infection in each individual. For each sampling site, prevalence, mean intensity and mean abundance (Bush et al. 1997) were examined. Infection by trematode larvae other than *F. hepatica* was also registered. Morphological identification of rediae and

cercariae was done following Frandsen and Christensen (1984) and Rondelaud et al. (2009b).

## Results

Three types of cercariae were found within snails from all localities: (1) white long simple tailed gymnocephalous cercariae with the ventral sucker on mid-ventral surface of the body (*F. hepatica*), (2) brown, shorter and ocellated amphistome cercariae (Paramphistomatidae), and (3) small bifurcated cercariae (Schistosomatidae). Identified *F. hepatica* cercariae were observed with rediae displaying a well-developed pharynx, collar rings and two appendages in the posterior end that match this species. Overall prevalence of *F. hepatica* was 2.94 %, with important variation among populations (min: 0 %, max: 11.4 %) (Table 2). No co-infection of *F. hepatica* with other trematode species (Paramphistomatidae and Schistosomatidae) in the same individual was observed.

In each population, the distribution of *F. hepatica* was strongly aggregated (Fig. 1), with the greatest number of non-infected individuals, and a few snails with a large amount of rediae. The intensity of infection by *F. hepatica* was highly variable among individuals, ranging from 1 to 76. However, it is noteworthy that in a sample of 100 individuals (V131), only one snail was infected but harboured 76 rediae. High within sample variation was also observed in V122 where two of 122 individuals were infected with 9 and 42 rediae, respectively.

## Discussion

Our results constitute the first approach to study natural infection rates in Cuban populations of *G. cubensis*, considered the main host of *F. hepatica* in Cuba (Vázquez et al. 2014). The other lymnaeid species occurring in Cuba, *P. columella*, has been found only twice infected in the field with a prevalence of 3 % (Gutiérrez et al. 2011) and 2 % (author unpublished data). *G. cubensis* is the most common lymnaeid species in bovine grazing areas which may be the reason of having found infected individuals in several localities.

## Overview of infection by Digeneans

The presence of other trematodes such as species of Paramphistomatidae found here can be explained by the role *G. cubensis* plays as a host of both parasitic groups in Cuba (Vázquez et al. 2013). In eastern France, the species *G. truncatula* has shown a prevalence of 1.8 % (summer season) and 2.5 % (autumn season) of *F. hepatica* infection coupled with values of 8.9 to 20.3 % for *Paramphistomum daubneyi* infection (Degueurce et al. 1999). In other host-parasite systems, prevalence values in the intermediate snails

**Table 1** Sampled localities, habitat type and existing definitive host species

Locality	Site	Location (GPS)	Habitat	Bovine species
Havana	La Coca	22.9577° N; -82.4649° W	Channel	Cows
Jaruco	CPA	23.0789° N; -81.9176° W	Flooded pasture	Buffalos
La Palma	V108	22.5589° N; -83.3678° W	Flooded pasture	Cows
La Palma	V122	22.5448° N; -83.3546° W	Flooded pasture	Cows
La Palma	V127	22.5682° N; -83.3761° W	Flooded pasture	Cows
La Palma	V131	22.5948° N; -83.3721° W	Flooded pasture	Cows
Artemisa	V503	22.7311° N; -82.6593° W	Flooded pasture	Buffalos
Artemisa	V505	22.7312° N; -82.6594° W	Pond	Buffalos

are also similar. In Guadeloupe, observed natural prevalence of infected *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni* ranges from 0.25 % (Pointier and Théron 1979) and 0.6 % (Théron et al. 2004). However, infected rats (definitive host) with *S. mansoni* in the same region were 91 % (Sire et al. 2001) and 94 % (Théron et al. 2004) which is similar to the reported bovine infection with *F. hepatica* in our studied area.

### Prevalences and risks of fasciolosis

The prevalences of *F. hepatica* we found (0–11.39 %) are consistent with those observed for sibling species in other transmission areas. For instance, an extensive survey on *G. truncatula* populations between 1960 and 1969 showed that prevalences in the UK are usually less than 2 % (Ollerenshaw 1971). A review done by (Rondelaud et al. 2009a) for European and African populations of *G. truncatula* gives prevalences from 3 % (Morocco) to 11.4 % (Spain). Similarly, Kleiman et al. (2007) reported 0.67 % of *Galba viatrix* infected by *F. hepatica* in Argentina while Dreyfuss et al. (2005) gave percentages between 1.4 and 1.8 % for *O. glabra* in Central France. The prevalences and intensities we observed seem therefore

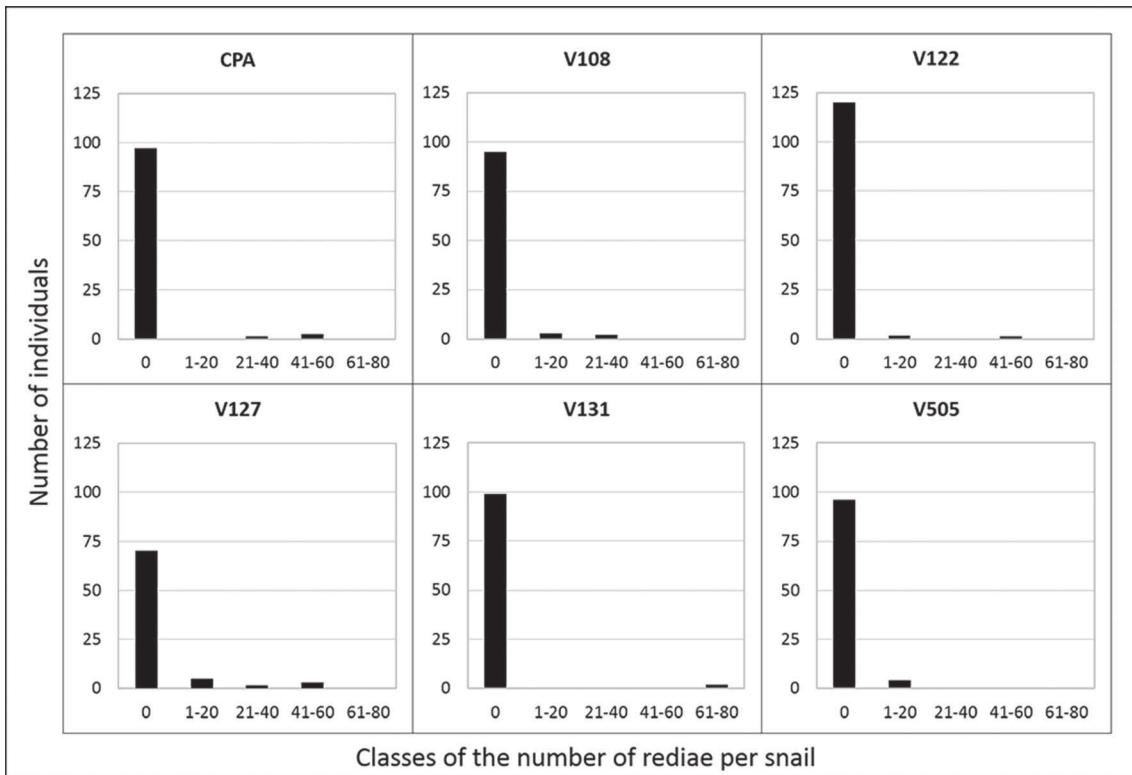
compatible with an efficient transmission of *F. hepatica* in the studied area. However, in *G. truncatula*, prevalences are higher (4.6–33 %) in areas where *F. hepatica* infects more than 70 % of definitive hosts than in areas with less than 30 % of definitive hosts parasitized (0–7.6 %), review in Rondelaud et al. (2009a). It is therefore surprising that we found moderate prevalences (0–11.39 %) in our study sites where *F. hepatica* has been detected in more than 75 % of bovines. However, we found in *G. cubensis* intensities ( $24.21 \pm 20.02$ ) more important than those recorded in *G. truncatula* (12.3–17.1, Mage et al. (2002)). The overall cercarian production in *G. cubensis* might therefore be as high as that in *G. truncatula*.

Different studies have underlined strong interannual variations in field prevalences due to effects of climatic conditions, particularly rainfall, on *F. hepatica* egg hatching. For instance in the UK, Ollerenshaw (1971) has shown that prevalences in *G. truncatula* can reach 20 % when conditions are favourable. Similarly, a survey of 141 sites in Central France during 12 years revealed oscillations from 3.3 to 7.2 % (Mage et al. 2002) and a study of two Algerian populations showed prevalences ranging from 4.6–5.9 % to 2.6–3.1 % (Mekroud et al. 2004). However, the differences observed in our study cannot

**Table 2** Prevalence, mean intensity and abundance in *Galba cubensis* naturally infected with *Fasciola hepatica* and occurrence of other trematode families

Site	N	n (prevalence %)	Infection by other trematodes (number of snails)	Mean intensity ( $\pm SD$ )	Mean abundance ( $\pm SD$ )
La Coca	135	0	Schistosomatidae (1)	—	0
CPA	100	3 (3)	—	35.67 ( $\pm 11.93$ )	1.07 ( $\pm 6.35$ )
V108	100	5 (5)	Schistosomatidae (1)	16.60 ( $\pm 13.05$ )	0.83 ( $\pm 4.48$ )
V122	122	2 (1.64)	—	26 ( $\pm 24.04$ )	0.43 ( $\pm 3.97$ )
V127	79	9 (11.39)	—	26.11 ( $\pm 19.29$ )	2.97 ( $\pm 10.39$ )
V131	100	1 (1)	Paramphistomatidae (3)	76	0.76 ( $\pm 7.6$ )
V503	80	0	Paramphistomatidae (2)	—	0
V505	100	4 (4)	—	6.06 ( $\pm 7$ )	0.28 ( $\pm 1.74$ )
Overall	816	24 (2.94)		24.21 ( $\pm 20.02$ )	0.71 ( $\pm 5.3$ )

N number of snails dissected, n number of snails infected by *F. hepatica*



**Fig. 1** Histograms of the distribution of the number of rediae (classes) of *Fasciola hepatica* per dissected individual of *Galba cubensis*

be related to different climatic conditions since all samples were taken in the same period.

#### Variations among populations

Although abundances were similar, we observed important variations among populations both in prevalences (0–11.39 %) and mean intensities (6.06–76). Since prevalences in the definitive hosts are of the same magnitude, we would have expected similar prevalences in *G. cubensis* among the different sites (see Rondelaud et al. 2009b for a comparison with *G. truncatula*). The differences in infection rates among populations might be due to environmental conditions (for instance rainfall which might favour the production of miracidia) and/or to differences in compatibility between snail population and parasite isolates. However, as we have discussed above, all samples were taken in the same period, therefore it is possible that patterns of infection would be driven by host-parasite compatibility. In an experimental study on compatibilities between *G. cubensis* and *F. hepatica*, Vázquez et al. (2014) showed both differences in susceptibility to the parasite between snail populations and differences in infectivity among *F. hepatica* strains. Two populations of *G. cubensis* (La Coca and V131) we analysed here for natural infestation were challenged to experimental infection by different isolates of *F. hepatica*, and La Coca proved to be less susceptible (overall prevalence 82 %) than snails from V131

(overall prevalence 100 %) (Vázquez et al. 2014). Here, we failed to find infected snails in La Coca, and natural prevalence in V131 was only 1 %. Vázquez et al. (2014) also tested liver fluke isolates from two of our study sites: La Palma and Artemisa. They showed that *F. hepatica* from La Palma is more virulent than those from Artemisa (snail survival at 25 days post-exposure: 55 and 79 %, respectively; mean number of rediae per snail:  $29 \pm 15.23$  and  $19 \pm 10.39$  SD, respectively). It is worth noting that in La Palma we recorded the highest prevalences (V127: 11.39 %) and intensities (V131: 76).

#### Intra-population variations

As usually observed in host-parasite interactions, the parasite distributions observed in each site are highly aggregated. Such results might be due to differences in susceptibility among individual snails. This would be due to genetic differences in compatibility or resistance to the parasite, as experimentally shown in *G. truncatula* by Meunier (2002) and/or to differences in snail age or condition at the time of infection. Indeed, in *G. truncatula*, the higher success is obtained when the molluscs are 4 weeks old (Rondelaud et al. 2009b). Moreover, well-fed *G. truncatula* are less susceptible to infection and exhibit a higher radial production than starved snails (Kendall 1949; Kendall and Ollerenshaw 1963; Abrous et al. 1999).

Stress induced by pollution can also increase the risks of infection (Abrous et al. 1999).

The variable number of rediae found inside each *G. cubensis* individual would depend on several factors, linked to the biology of parasite, of the host and the interaction between them. Mean numbers of rediae observed in naturally infected *G. truncatula* from France range between 15.8 and 25.7 when coming from one or two sporocysts, respectively (Rondelaud et al. 2004a). In the current study, some individuals have attained more than 40 rediae with an observed maxima of 76 rediae. This fact suggests a high susceptibility through a strong compatibility of Cuban populations of *G. cubensis* to the infection with existing *F. hepatica* strains.

Understanding transmission ecology of a given parasite through its hosts is a key aspect in the epidemiology of the disease. Differences found in prevalence among samples show that transmission of *F. hepatica* may be highly variable at a specific locale. Although high densities in snail populations increase the probability of becoming infected and transmitting a given parasite, a larger portion may still remain uninfected. The probability of one particular snail of becoming infected is strictly dependent on its particular ecology and that of the parasite and definitive host. This probability may actually be very low for the entire population but conversely high for a small portion of the same population and it can be affected through: (1) temporal variation of the host population (it might not match that of the parasite or the definitive host for a particular site); (2) abundance peaks of populations dynamics (if densities are low at the time of introduction of the parasite the probability of encounter drops); (3) spatial distribution in the habitat (aggregated distribution of hosts near the introduction site of the parasite prompt transmission while a scattered distribution decrease it); and (4) the parasite may have a narrow tolerance to the particular physicochemical factors and die before reaching its host. These aspects may explain why field prevalence of *F. hepatica* in its intermediate host might be particularly variable.

Our results show that the transmission of *F. hepatica* may be assured even when the number of infected snails remains relatively low. A single lymnaeid producing cercariae may be sufficient to maintain infestation in a relatively large area and eventually infect cattle. Flooded environments would enhance dispersion of cercariae and metacercariae (encysted larvae) and increase infection risk. However, floatability of cysts has been found to be very low, limiting the infection of definitive hosts (Rondelaud et al. 2004b). Control strategies should then aim to recognize the actual locations of active fascioliasis transmission within a particular biotope even when snail populations may be scattered throughout a larger area. The fact that not all sampled localities in this study evidenced infected snails, even when cattle are reported infected, reinforces the idea that small values in snail natural prevalence of *F. hepatica* infection do matter.

**Acknowledgements** The authors would like to thank local veterinary and cowsheds authorities for their assistance during the field samplings. This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (BEST grant to A.A.V.).

## References

- Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G (1999) *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: influence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. Parasitol Res 85:765–769
- Bush A, Lafferty K, Lotz J, Shostak A (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J Parasitol 83(4):575–583
- Cichy A, Faltýnková A, Zbikowska E (2011) Cercariae (Trematoda, Digenea) in European freshwater snails—a checklist of records from over one hundred years. Folia Malacol 19(3):165–189. doi:[10.2478/v10125-011-0023-6](https://doi.org/10.2478/v10125-011-0023-6)
- Correa A, Escobar JS, Durand P, Renaud F, David P, Jarne P, Pintier JP, Hurtrez-Boussès S (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. Evol Biol 10:381. doi:[10.1186/1471-2148-10-381](https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-381)
- Cruz-Mendoza I, Figueroa J, Correa D, Ramos-Martínez E, Lecumberri-López J, Quiroz-Romero H (2004) Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of Mexico. Vet Parasitol 121:87–93. doi:[10.1016/j.vetpar.2004.02.006](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.02.006)
- Degueurce F, Abrous M, Dreyfuss G, Rondelaud D, Gevrey J (1999) *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the prevalence of natural or experimental infections in four species of freshwater snails in eastern France. J Helminthol 73:197–202
- Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D (2003) Natural infections of *Omphiscola glabra* (Lymnaeidae) with *Fasciola hepatica* in central France. Parasitol Res 91:458–491. doi:[10.1007/s00436-003-0892-8](https://doi.org/10.1007/s00436-003-0892-8)
- Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D (2005) *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. Parasitol Res 95:278–282. doi:[10.1007/s00436-004-1269-3](https://doi.org/10.1007/s00436-004-1269-3)
- Ferrer J, Perera G, Yong M (1985) Estudio de los moluscos fluviales de una localidad afectada por un brote de fascioliasis. Rev Cubana Med Trop 37(2):155–160
- Frandsen F, Christensen N (1984) An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance. Acta Trop 41:181–202
- Gürel G, Göçmen B (2007) Natural Infection of *Helix aspersa* (Mollusca: Pulmonata) by Dicrocoeliidae (Digenea) Larval Stages in Izmir, Turkey. Türkiye Parazitol Derg 31(2):150–153
- Gutiérrez A et al (2011) First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. J Helminthol 85:109–111. doi:[10.1017/S0022149X10000350](https://doi.org/10.1017/S0022149X10000350)
- Hamed N, Hammami H, Khaled S, Rondelaud D, Ayadi A (2009) Natural infection of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae) in *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae) in northern Tunisia. J Helminthol 83:271–273. doi:[10.1017/S0022149X08207947](https://doi.org/10.1017/S0022149X08207947)
- Hurtrez-Boussès S, Meunier C, Durand C, Renaud F (2001) Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). Microb Infect 3:841–849
- Kendall S (1949) Nutritional factors affecting the rate of development of *Fasciola hepatica* in *Limnaea truncatula*. J Helminthol 23:179–190
- Kendall S, Ollerenshaw C (1963) The effect of nutrition on the growth of *Fasciola hepatica* in its snail host. Proc Nutr Soc 22:41–46
- Kleiman F, Pietrovsky S, Prepelitchi L, Carbojo A, Wisnivesky-Colli C (2007) Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean

- Patagonian valleys, Argentina. *Vet Parasitol* 145:274–286. doi:10.1016/j.vetpar.2006.12.020
- Mage C, Bourgne H, Toullieu J, Rondelaud D, Dreyfuss G (2002) *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet Res* 33:439–447
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 69:41–146. doi:10.1016/S0065-308X(09)69002-3
- Mekroud A, Benakhla A, Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G (2004) Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep, and the host snail (*Galba truncatula*) in north-eastern Algeria. *Parasitol Res* 92:502–505. doi:10.1007/s00436-004-1072-1
- Meunier C (2002) Fonctionnement des populations hôtes et adaptation au parasite dans l'interaction limnée-douve (mollusque-trématode). PhD Thesis. Université de Montpellier II, France., p 107
- Ollerenshaw C (1971) Forecasting liver fluke disease in England and Wales 1958–1968 with a comment on the influence of climate on the incidence of the disease in some other countries. *Vet Med Rev* 2(3):289–312
- Pointier J, Théron A (1979) La schistosomose intestinale dans les forêts marécageuses à *Pterocarpus* de Guadeloupe (Antilles françaises). Ecologie du vecteur, *Biomphalaria glabrata* et de son parasite *Schistosoma mansoni*. *Ann Parasitol* 54(1):43–56
- Relf V, Good B, McCarthy E, de Waal T (2009) Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family Succineidae in Ireland. *Vet Parasitol* 163:152–155. doi:10.1016/j.vetpar.2009.04.003
- Rojas L, Vázquez A, Domenech I, Robertson L (2010) Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends Parasitol* 26(1):26–34. doi:10.1016/j.pt.2009.10.005
- Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G (2004a) *Fasciola hepatica*: the developmental patterns of radial generations in naturally infected *Galba truncatula*. *Parasitol Res* 94:183–187. doi:10.1007/s00436-004-1191-8
- Rondelaud D, Vignoles P, Vareille-Morel C, Abrous M, Mage C, Mouzet R (2004b) *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: field observations on the transport and outcome of floating metacercariae in running water. *J Helminthol* 78:173–177. doi:10.1079/JOH2003215
- Rondelaud D, Belfaiza M, Vignoles P, Moncef M, Dreyfuss G (2009a) Radial generations of *Fasciola hepatica*: a review. *J Helminthol* 83: 245–254. doi:10.1017/S0022149X09222528
- Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G (2009b) La Limnée tronquée, un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire. PULIM, Limoges., p 283
- Sire C, Durand P, Pointier J, Théron A (2001) Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*): infrapopulation differentiation at microspatial scale. *Int J Parasitol* 31:1609–1616
- Théron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P (2004) Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitol* 129:571–585. doi:10.1017/S0031182004005943
- Vázquez A, Sánchez J, Alba A, Rodríguez E, Pino A (2013) Primer reporte de infección natural de *Galba cubensis* (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) con larvas de Paramphistomidae (Trematoda: Digenea) en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 65(3):394–397
- Vázquez A, Sánchez J, Pointier J, Théron A, Hurtrez-Boussès S (2014) *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *J Helminthol* 88(4):434–440. doi:10.1017/S0022149X13000382
- WHO (2007) The “neglected” neglected worms. Actions Against Worms Newsletter December(10):1–8
- Żbikowska E, Nowak A (2009) One hundred years of research on the natural infection of freshwater snails by trematode larvae in Europe. *Parasitol Res* 105:301–311. doi:10.1007/s00436-009-1462-5

## *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*

A.A. Vázquez<sup>1</sup>, J. Sánchez<sup>1</sup>, J.-P. Pointier<sup>2</sup>, A. Théron<sup>3\*</sup>  
and S. Hurtrez-Boussès<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Malacología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Apartado Postal 601, Marianao 13, La Habana, Cuba; <sup>2</sup>USR 3278 CNRS-EPHE, Criobe Université de Perpignan, 66860 Perpignan, France; <sup>3</sup>CNRS, Ecologie et Evolution des Interactions, UMR 5244, Université de Perpignan Via Domitia, 66860 Perpignan, France; <sup>4</sup>Laboratoire Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses, UMR 2724 CNRS-IRD, IRD 911 avenue Agropolis, BP64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

(Received 26 December 2012; Accepted 18 April 2013; First Published Online 31 May 2013)

### Abstract

In Cuba, only two lymnaeid snails, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*, with different ecology and distribution patterns, are intermediate hosts for *Fasciola hepatica*. The compatibility of these two species as hosts was analysed through their rates of infection, the production of rediae and survivorship when exposed to *F. hepatica* miracidia. Ten populations of *G. cubensis*, eight of *P. columella* collected from various habitats and six isolates of *F. hepatica* sampled in slaughterhouses from different localities were tested. Our results clearly demonstrate that *G. cubensis* is a more compatible host for *F. hepatica* in Cuba when compared with *P. columella*. However, the role that *P. columella* may have in fascioliasis transmission under certain conditions should not be disregarded. Variation in infectivity among isolates of *F. hepatica* were also observed and may explain why some regions in Cuba are more commonly subjected to fascioliasis outbreaks.

### Introduction

Fascioliasis is an important veterinary and medical problem across the world (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001; Mas-Coma *et al.*, 2009) and is also one of the most widely distributed (latitudinal, longitudinal and altitudinal) of the vector-borne diseases (Mas-Coma *et al.*, 2005). Strategies of control are therefore needed; they undoubtedly have to be supported by a better understanding of the transmission of this disease. In particular, it is extremely important to further understand the role

played by lymnaeid molluscs in the life cycle of *Fasciola* spp. trematodes. Among them, *Fasciola hepatica* (the common liver fluke) is the species which has the largest geographical distribution and the widest definitive-host spectrum, and which is the main cause of human infections (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001; Mas-Coma *et al.*, 2009). Lymnaeid snails have been subjected to many studies (taxonomical, ecological and parasitological) regarding their role as intermediate hosts of parasites with medical and veterinary importance, and particularly for their involvement in fascioliasis transmission (Bargues & Mas-Coma, 1997; Gutiérrez *et al.*, 2000, 2005; Rondelaud *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2011). Indeed, about 20 species of lymnaeids have been described to

\*E-mail: theron@univ-perp.fr

host *F. hepatica* (Correa *et al.*, 2010). The success of the extremely wide geographical distribution of this trematode can probably be attributed to its extraordinary ability to adapt to a wide range of definitive (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001) and intermediate hosts (Correa *et al.*, 2010). While mammals are infected with the adult stage of the parasite (liver deterioration and obstruction of bile ducts), the introduction and spread of the parasite depends ultimately on the occurrence and compatibility with the snail hosts inhabiting new localities (Rondelaud *et al.*, 2005). Several studies have pointed out how sympatric strains of *F. hepatica* and lymnaeid species may increase transmission through possible local adaptation (Hurtrez-Boussès *et al.*, 2001). Other observations, however, state that under certain conditions, allopatric combinations of flukes and snails turn out to be highly compatible and thus may enhance transmission (Gasnier *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2009).

In Cuba, fascioliasis is a major veterinary problem in most cattle farms and in other minor hosts, such as goats (Beovides *et al.*, 2006). Although it is not recognized as a huge health problem for humans, several outbreaks have been recorded in the past two decades (Rojas *et al.*, 2010), and it is feared that new outbreaks will occur in the future. The only lymnaeid snails so far described in Cuba are *Galba cubensis* and the invasive species *Pseudosuccinea columella*, for which populations are yet to establish in the eastern region of the country (Vázquez *et al.*, 2009). The former is considered the main intermediate host of *F. hepatica* (Perera, 1996; Rojas *et al.*, 2010). The latter, however, although perfectly compatible when infected under laboratory conditions (Gutiérrez *et al.*, 2002), has been found naturally infected only once (Gutiérrez *et al.*, 2011). Interestingly, some populations of *P. columella* have been described to be completely resistant to experimental infestations with *F. hepatica* (Gutiérrez *et al.*, 2003;

Calienes *et al.*, 2004). However, the potential diversity of *F. hepatica* isolates has been neglected in these preliminary studies.

In this paper, we describe the results of experimental infections using different combinations of *F. hepatica* geographic isolates and populations of *G. cubensis* and *P. columella* from different localities. The aim of this study is to better understand and discuss the possible outcomes of these combinations and their impact on fascioliasis transmission in Cuba.

## Materials and methods

### Sampling of snail populations and parasite isolates

Biological samples of both lymnaeid snails and *F. hepatica* isolates were collected from different localities in Cuba (fig. 1) and brought back to the Laboratory of Malacology at the Tropical Medicine Institute in Havana. Ten populations of *G. cubensis* and eight of *P. columella* were collected from different habitats during 2011 and 2012, using sieves and soft forceps (up to 50 individuals per locality). The snails from each population were reared in laboratory conditions at a temperature ranging between 26 and 28°C until a subsequent generation was obtained. Snails were fed with algae using a routine method (Sánchez *et al.*, 1995) in Petri dishes containing up to ten individuals. Three of the eight *P. columella* populations were resistant (La Coca, La Playita and Babiney) and were included considering the phenotypic markers of resistance as described by Gutiérrez *et al.* (2003). Briefly summarized, resistant snails have a significantly less rounded shell and aperture than susceptible ones and the intensity and distribution pattern of the spots of the mantle pigmentation are clearly different between resistant and susceptible populations.

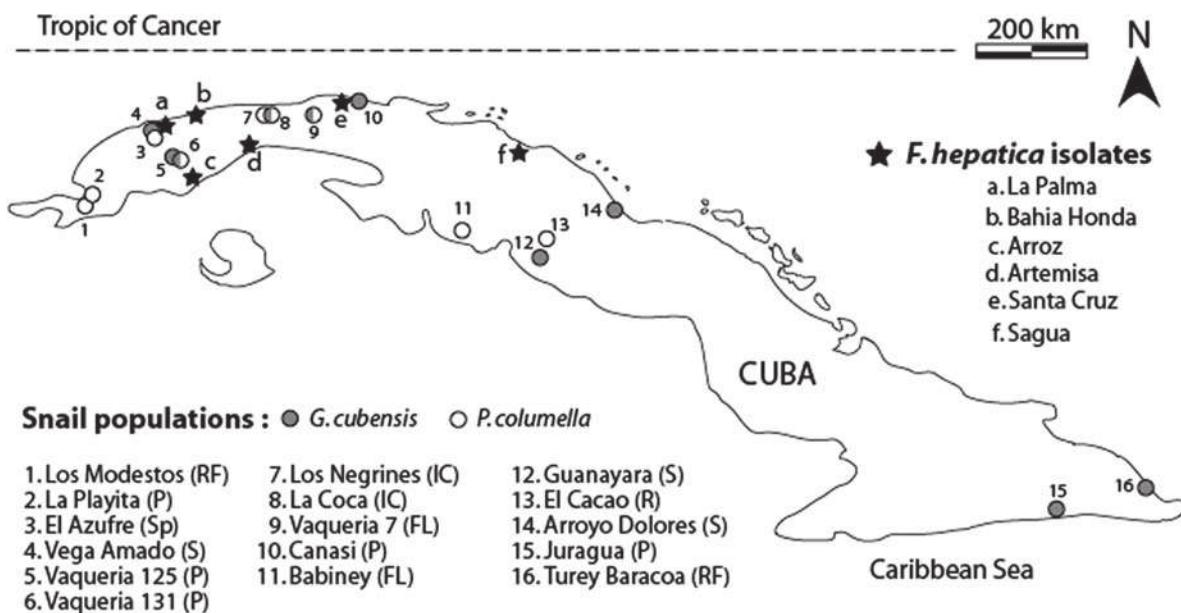


Fig. 1. Geographical distribution of collecting sites for lymnaeid snails and parasite isolates in Cuba. RF, rice field; P, pond; Sp, spring; S, stream; IC, irrigation channel; FL, flooded land; R, river.

A total of six isolates of *F. hepatica* were sampled in slaughterhouses from different localities in Cuba (Arroz, Bahía Honda, La Palma, Artemisa, Santa Cruz and Sagua) (fig. 1). Adults of *F. hepatica* were recovered alive from infected bovine livers and placed in a solution containing glucose (9%) and sodium chloride (0.85%), ideal for egg laying. Three hours later, the eggs were placed in a saline solution (0.85%) and stored in the dark at 4°C. Adults were extracted and saved in ethanol (95%) for further studies.

#### Experimental infections

Once the snails started laying egg masses, the eggs of *F. hepatica* were placed in spring water, in the dark at 28°C for miracidia maturation. After 14 days, the eggs were exposed to white light to induce miracidia hatching. Thirty snails of age 1 week from each locality were placed in a 96-well plate containing spring water (one snail per well). Five free-swimming miracidia were collected and placed into each well. Spring water was added to completely fill each well, and the wells were then covered with a glass plate in order to keep the snails submerged. Three hours post-exposure, the snails were returned to their rearing containers. All exposed snails were checked for infection through dissection 25 days post-exposure. A total of 15 individuals of each species/population were kept unexposed as controls. Dead snails during the trials were always checked for infection.

In order to measure redial intensity, the snails were squashed on day 25 post-exposure and carefully dissected using a common dissection kit and a stereomicroscope, in order to count all free rediae (Caron *et al.*, 2008). Results are divided into: (1) susceptibility of the lymnaeid snails to *F. hepatica* infection; (2) differences in susceptibility among snail populations; and (3) compatibility of *Fasciola* isolate/snail populations in terms of redial intensity (Rondelaud *et al.*, 2004) (some snail populations tested with certain isolates of *F. hepatica* were not available when rediae were counted). Compatibility was evaluated in terms of infection rate (% of infected snails), number of rediae per snail and survival of individuals post-infection.

#### Data analysis

Comparisons among groups were analysed by one-way and factorial analysis of variance (ANOVAs; snail populations and *F. hepatica* isolates as factors) and between species of lymnaeids by means of a Mann-Whitney U-test for non-parametric data. A Tukey test was used to determine which means were different. Differences were always considered statistically significant at values of  $P < 0.05$ .

### Results

Experimental infection assays with each lymnaeid species showed different levels of susceptibility towards *F. hepatica* (fig. 2, table 1). *Galba cubensis* was globally more susceptible to infection (mean 71%, range 52–93%) than *P. columella* (mean 49%, range 17–56%). Not only were

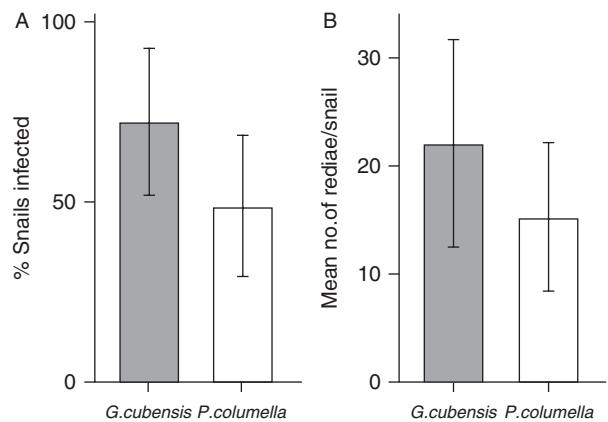


Fig. 2. The proportion (%) of infected snails (A) and production of rediae (B) in *G. cubensis* (grey) and *P. columella* (white); resistant populations of *P. columella* are not included and vertical bars denote standard deviation.

a greater number of *G. cubensis* individuals infected but greater numbers of rediae were found per snail (fig. 2). The mean value of rediae was  $22.43 \pm 11.82$  (SD) in *G. cubensis* whereas *P. columella* showed a lower mean value of  $15.35 \pm 8.35$  (SD). However, individuals of both species reached maximum values of approximately 55 rediae per snail, although such intensities were usually rare.

The three populations of *P. columella* showing the typical phenotype of resistance (see Gutiérrez *et al.*, 2003) showed no evidence of infection when exposed to any isolate of *F. hepatica*.

Variability was observed among the populations of *G. cubensis*, with some of them being 100% susceptible to a particular isolate of *F. hepatica* (table 1), while other populations showed infection rates less than 30%. More pronounced variations in infection rates was observed among populations of *P. columella* exposed to various isolates of *F. hepatica*.

*Galba cubensis* snails from Vega Amado, Arroyo Dolores, Vaquería 7 and Vaquería 125 produced twice as many rediae (mean  $28 \pm 8.5$ ) than those from La Coca and Juraguá (mean  $14 \pm 6.5$ ) regardless of the isolate of *F. hepatica* used (fig. 3). On the contrary, populations of *P. columella*, displayed a more constant result, similar to the values of the least productive populations of *G. cubensis* (fig. 3). It is important to note, however, that no correlations were found between the infection rates and the number of rediae per snail in either species (*G. cubensis*:  $r = -0.118$ ,  $P = 0.542$ ; *P. columella*:  $r = 0.144$ ,  $P = 0.569$ ).

Whatever the snail population or the snail species exposed, the infectivity of the *F. hepatica* isolates from Arroz and Artemisa appeared highly infective (97 and 85% for *G. cubensis*, and 92 and 87% for *P. columella*, respectively), while the parasite isolate of Sagua always had very low infection rates (19 and 21%) (table 1). Isolates of *F. hepatica* also produced different numbers of rediae per snail regardless of the combination of lymnaeid species/populations used (fig. 4). Santa Cruz and Bahía Honda were the most productive isolates and Artemisa the least.

Table 1. Infection rates (%) of *G. cubensis* and *P. columella* from different localities experimentally exposed to different *F. hepatica* geographic isolates (data on day 25 post-exposure,  $N = 30$  for every population). Three populations of *P. columella* originating from Babiney, La Playita and La Coca were resistant to the six isolates of *F. hepatica* (data not shown).

	<i>F. hepatica</i> isolates						
	La Palma	Bahia Honda	Arroz	Artemisa	Santa Cruz	Sagua	Mean %
<i>G. cubensis</i>							
Vega Amado	—	—	—	—	70	23	47
Vaquería 125	—	—	100	73	—	—	87
Vaquería 131	—	—	100	—	—	—	100
La Coca	—	—	97	87	63	—	82
Vaquería 7	—	—	100	83	83	20	72
Canasi	—	—	—	—	—	—	90
Guanayara	—	—	100	—	—	—	100
Arroyo Dolores	53	33	100	83	90	0	60
Juraguá	—	—	83	100	—	33	72
Turey Baracoa	—	—	100	—	—	—	100
Mean %	53	33	97	85	77	19	
<i>P. columella</i>							
Los Modestos	—	—	80	—	—	—	80
El Azufre	—	—	100	—	—	—	100
Vaqueria 125	—	—	97	77	20	10	51
Los Negrines	—	—	—	97	57	43	66
Vaqueria 7	43	40	—	—	30	10	27
Mean %	43	40	92	87	36	21	

Compatibility regarding the number of snails that remained alive on day 25 post-infection varied slightly within snail species and between parasite isolates (fig. 5). Parasite isolates from Artemisa, Santa Cruz and Arroz were the most compatible with *G. cubensis*. Survival was clearly different between lymnaeid species, indicating the lower compatibility of parasites with *P. columella* and little difference in compatibility between parasite isolates with *P. columella*.

## Discussion

Differences found between both species regarding the infection rates, the production of rediae and survival, clearly show that *G. cubensis* is actually the most compatible host for *F. hepatica* in Cuba, and that

*P. columella* is a snail host of secondary importance. Perera (1996) and Vázquez *et al.* (2009) predicted this result based on both the presence of *G. cubensis* in every epidemiological event and the distribution patterns of both lymnaeids. However, variation in compatibility between the two species was never confirmed through experimental infection series using various isolates of *F. hepatica*. *Galba cubensis* is capable of settling in a wide range of freshwater ecosystems (even some sites highly influenced by human activity, where *P. columella* is unable to settle), including those suited for fascioliasis transmission (Vázquez *et al.*, 2009). It is also important to note that in the most endemic areas of fascioliasis transmission in western Cuba (Rojas *et al.*, 2010), at least three populations of resistant *P. columella* have been found, reducing the probability of transmission by this species.

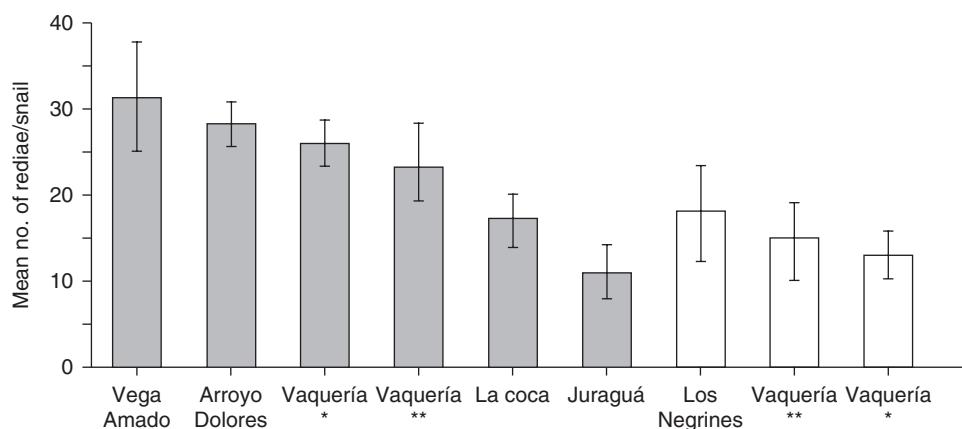


Fig. 3. The production of rediae in infected *G. cubensis* (grey) and *P. columella* (white) from collecting sites (\*, 7 and \*\*, 125) on exposure to five miracidia of *F. hepatica*; vertical bars denote standard deviation.

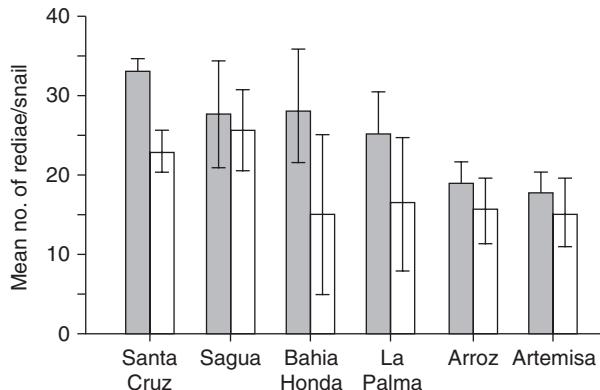


Fig. 4. The production of rediae of *F. hepatica* isolates from six collecting sites infecting *G. cubensis* (grey) and *P. columella* (white); vertical lines denote standard deviation.

Although these findings may suggest that transmission would be reduced in this region, it is bolstered by the number of *G. cubensis* usually found sharing resistant *P. columella* habitats (Gutiérrez et al., 2005; Vázquez et al., 2009). Finally, our results showing variation in infectivity among isolates of *F. hepatica* may explain why some regions in Cuba are more commonly subjected to fascioliasis outbreaks (resulting in more infected individuals) than others. Unfortunately, it was not possible to test other parasite isolates from the eastern region in this study, but our results matched expectations regarding *F. hepatica* transmission in western Cuba.

However, beside the populations of *P. columella* totally resistant to *F. hepatica*, some others (e.g. El Azufre) showed high susceptibility but low post-infection survival when challenged with a particular isolate of *F. hepatica* (e.g. Arroz). Furthermore, studies comparing the susceptibility to infection in North America have shown that *P. columella* was more susceptible than *G. cubensis* to *F. hepatica* infection (Cruz-Reyes & Malek, 1987). The species *P. columella* has also been commonly found infected in the field in Argentina (Moriena et al., 2008) and Brazil (Oliveira et al., 2002). It is interesting to note that such variations observed in susceptibility between *P. columella* populations seem not to be correlated with their genetic diversity. Indeed, recent studies with both highly polymorphic (microsatellites) and conserved markers (ITS-1, ITS-2, 16S) showed that *P. columella* samples collected across the world, and including 22 populations from Cuba, belong to the same species and display very little or no genetic diversity between populations (Nicot et al., 2008; Correa et al., 2010, 2011). Therefore, *P. columella* plays a role in fascioliasis transmission under certain conditions, and it has been recently observed in a rice field population in Cuba (Gutiérrez et al., 2011).

Our results in terms of host-parasite interactions suggest that some snail populations confronted with allopatric *F. hepatica* may result in infections. Certain species/populations were more compatible with distant parasite isolates, indicating that poor management of infected cattle or the introduction of highly compatible

snails might trigger new outbreaks of fascioliasis in some areas. Similar results were obtained in Brazil (Coelho et al., 2009) and in France (Gasnier et al., 2000) with allopatric combinations. However, diversity was found in this type of interaction, suggesting that relationships between snails and parasites may vary according to several variables (e.g. snail ecology, parasite and snail genetic diversity, definitive host management). Sympatric combinations of snails and parasites have been found to be more (Osnas & Lively, 2011) or less efficient (Goumghar et al., 2001). Local adaptation in this interaction has been reviewed by Hurtrez-Boussès et al. (2001). The outcome of this relationship in terms of parasite infection is likely to be strongly related to: (1) evolutionary time of interaction (older combinations might be expected to be more adapted); (2) dispersal abilities of host and parasite (see Gandon et al., 1996; Gandon & Michalakis 2002), local adaptation being expected when parasite dispersal is higher than host dispersal, which is probably the case for the mollusc/liver fluke system; (3) ecology of intermediate and definitive hosts (similar ecological requirements boost the probability of encounter); and (4) genetic diversity (compatible alleles of snails and parasites may increase infection and parasite reproduction).

According to Correa et al. (2011), the scenario of fascioliasis transmission strongly depends on the presence of lymnaeid diversity, since susceptibility to *F. hepatica* infection varies across species. Fortunately, the Cuban scenario is easier to describe, with the presence of only two potential lymnaeid snail hosts of different ecology and distribution patterns. While *G. cubensis* is widely distributed in Cuba with populations in natural and polluted habitats, *P. columella* is yet to be found in the eastern region and seems to prefer natural habitats (Vázquez et al., 2009). This paper shows that the two species are also different in susceptibility and their transmission abilities are closely related to the particular isolate of *F. hepatica*. Studies on the genetic diversity of *F. hepatica* are therefore needed to elucidate the problem of the diversity of this parasite.

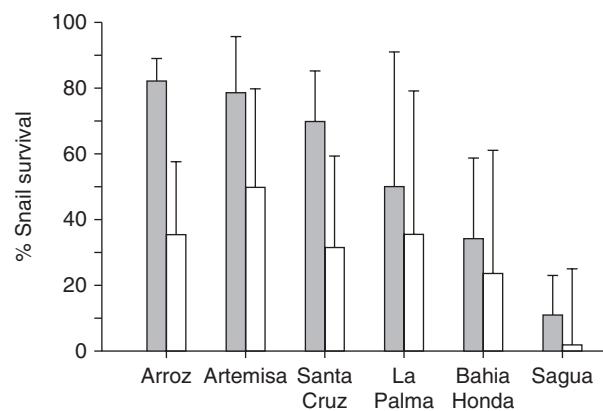


Fig. 5. Survival of infected *G. cubensis* (in grey) and *P. columella* (in white) on day 25 post-exposure with each *F. hepatica* isolate.

### Acknowledgements

This work was supported by the Institut de Recherche pour le Développement (BEST grant to A.A.V.).

### References

- Bargues, M. & Mas-Coma, S. (1997) Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18s rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 569–577.
- Beovides, L., Silveira, E., Pérez, J. & Olazábal, E. (2006) Evaluación de los factores que inciden en la mortalidad por fascioliasis en la provincia de Villa Clara, Cuba. *Revista Electrónica de Veterinaria* **7**, n020206.
- Calienes, A., Fraga, J., Pointier, J.-P., Yong, M., Sánchez, J., Coustau, C., Gutiérrez, A. & Théron, A. (2004) Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica* **92**, 83–87.
- Caron, Y., Rondelaud, D. & Losson, B. (2008) The detection and quantification of a digenetic infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitology Research* **103**, 735–744.
- Coelho, L., Lima, W. & Guimarães, M. (2009) Sympatric and allopatric combinations of *Lymnaea columella* and *Fasciola hepatica* from southern and south-eastern Brazil. *Journal of Helminthology* **83**, 285–288.
- Correa, A., Escobar, J.S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J.-P. & Hurtrez-Boussès, S. (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 1–12.
- Correa, A., Escobar, J.S., Noya, O., Velasquez, L.E., Gonzalez-Ramirez, C., Hurtrez-Boussès, S. & Pointier, J.-P. (2011) Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fascioliasis. *Infection Genetics and Evolution* **11**, 1978–1988.
- Cruz-Reyes, A. & Malek, E. (1987) Suitability of six lymnaeid snails for infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* **24**, 203–210.
- Gandon, S. & Michalakis, Y. (2002) Local adaptation, evolutionary potential and host–parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 451–462.
- Gandon, S., Capowicz, Y., Dubois, Y., Michalakis, Y. & Olivier, I. (1996) Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society London B* **263**, 1003–1009.
- Gasnier, N., Rondelaud, D., Abrous, M., Carreras, F., Boulard, C., Diez-Baños, P. & Cabaret, J. (2000) Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *International Journal for Parasitology* **30**, 573–578.
- Goumghar, M., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., Benlemlih, M. & Cabaret, J. (2001) More efficient allopatric combinations of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* due to modification of radial development? *Parasitology Research* **87**, 1016–1019.
- Gutiérrez, A., Perera, G., Yong, M., Sánchez, J. & Wong, L. (2000) Life-history traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under experimental exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **95**, 747–752.
- Gutiérrez, A., Yong, M., Perera, G., Sánchez, J. & Théron, A. (2002) *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea): its effect on the life history traits of *Pseudosuccinea columella* (Gasteropoda: Lymnaeidae), an uncommon interaction. *Parasitology Research* **88**, 535–539.
- Gutiérrez, A., Pointier, J.-P., Yong, M., Sánchez, J. & Théron, A. (2003) Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. *Parasitology Research* **90**, 129–134.
- Gutiérrez, A., Hernández, D. & Sánchez, J. (2005) Variation of snail's abundance in two water bodies harboring strains of *Pseudosuccinea columella* resistant and susceptible to *Fasciola hepatica* miracidial infection, in Pinar del Río Province, Cuba. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **100**, 725–727.
- Gutiérrez, A., Vásquez, A.A., Hevia, Y., Sánchez, J., Correa, A.C., Hurtrez-Boussès, S., Pointier, J.-P. & Théron, A. (2011) First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. *Journal of Helminthology* **85**, 109–111.
- Hurtrez-Boussès, S., Meunier, C., Durand, C. & Renaud, F. (2001) Dynamics of host–parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection* **3**, 841–849.
- Mas-Coma, S., Bargues, M. & Valero, M. (2005) Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* **35**, 1255–1278.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A. & Bargues, M.D. (2009) *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology* **69**, 41–146.
- Moriena, R., Moriena, R.A., Alvarez, J.D., Pietrokovsky, S., Rubel, D., Prepelitchi, L., Racioppi, O. & Wisnivesky, C. (2008) Presencia de *Pseudosuccinea columella* naturalmente infestada con *Fasciola hepatica* en Santo Tomé (Corrientes, Argentina). *Revista Veterinaria* **19**, 147–149.
- Nicot, A., Dubois, M.P., Debain, C., David, P. & Jarne, P. (2008) Characterization of 15 microsatellite loci in the pulmonate snail *Pseudosuccinea columella* (Mollusca, Gastropoda). *Molecular Ecology Resources* **8**, 1281–1284.
- Oliveira, S., Fujii, T., Filha, E. & Martins, A. (2002) Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), no vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo* **1**, 29–37.
- Osnas, E. & Lively, C. (2011) Parasite dose, prevalence of infection and local adaptation in a host–parasite system. *Parasitology Research* **109**, 675–687.
- Perera, G. (1996) Ecología des mollusques d'eau douce d'intérêt médical et vétérinaire à Cuba. PhD Thesis, University of Perpignan.

- Rojas, L., Vázquez, A., Domenech, I. & Robertson, L.** (2010) Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends in Parasitology* **26**, 26–34.
- Rondelaud, D., Vignoles, P. & Dreyfuss, G.** (2004) *Fasciola hepatica*: the developmental patterns of redial generations in naturally infected *Galba truncatula*. *Parasitology Research* **94**, 183–187.
- Rondelaud, D., Hourdin, P., Vignoles, P. & Dreyfuss, G.** (2005) The contamination of wild watercress with *Fasciola hepatica* in central France depends on the ability of several lymnaeid snails to migrate upstream towards the beds. *Parasitology Research* **95**, 305–309.
- Sánchez, R., Perera, G. & Sánchez, J.** (1995) Cultivo de *Fossaria cubensis* (Pfeiffer) (Pulmonata: Lymnaeidae) hospedero intermedio de *Fasciola hepatica* (Linnaeus) en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* **47**, 71–73.
- Vázquez, A., Sánchez, J. & Hevia, Y.** (2009) Distribución y preferencia de hábitats de moluscos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* **61**, 248–253.