

Dynamique de la fasciolose dans un système fortement anthropisé : la Camargue

Emeline Sabourin

▶ **To cite this version:**

Emeline Sabourin. Dynamique de la fasciolose dans un système fortement anthropisé : la Camargue. Microbiologie et Parasitologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTG047 . tel-01976817

HAL Id: tel-01976817
https://theses.hal.science/tel-01976817

Submitted on 10 Jan 2019

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 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie des mécanismes des interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques

École doctorale GAIA
Unité de recherche MIVEGEC

Dynamique de la fasciolose dans un milieu fortement anthropisé : La Camargue

Présentée par Emeline Sabourin

Le 28 novembre 2018

Sous la direction de Sylvie Hurtrez-Boussès
et Marion Vittecoq

Devant le jury composé de

Gilles Dreyfuss, Professeur émérite, Université de Limoge	Rapporteur
Alain Chauvin, Professeur des universités, Oniris	Rapporteur
Guillaume Mitta, Professeur des universités, Université de Perpignan	Examinateur
Antonio Vázquez Perera, Chargé de recherche, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí	Examinateur
Marion Vittecoq, Chargée de recherche, Fondation Tour du Valat	Co-encadrante
Sylvie Hurtrez-Boussès, Professeur des universités, Université de Montpellier	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements :

Voilà enfin le moment d'écrire les remerciements. Ces trois années ont été fastidieuses et je peux le dire aujourd'hui je suis contente d'être arrivée au bout de cette aventure. Des périodes ont semblé n'en plus finir, le temps s'écoulait tellement lentement et pourtant au final c'est passé tellement vite et cela grâce à toutes les personnes qui m'ont accompagnée pendant cette thèse.

Pour commencer, je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse : Antonio Vásquez, Guillaume Mitta, et en particulier mes deux rapporteurs Gilles Dreyfuss et Alain Chauvin.

Un immense merci à Sylvie et Marion, mes directrices de thèses, qui m'ont accompagnée pendant ces trois ans. Sylvie, merci pour votre enthousiasme, pour vos conseils et de m'avoir fait confiance. Marion, merci pour ces sessions brainstorming, tes danses de la victoire, tous tes conseils, tes encouragements et d'avoir toujours cru en moi malgré mes nombreux doutes.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Thierry de Meeus, Patrick Durand, Olivier Boutron, Olivier Pineau et Nicolas Bonel. Merci pour ces discussions toujours très constructives qui m'ont été d'un grand secours. Même si mon premier comité fait encore partie de mes pires cauchemars, cette première expérience m'a permis de comprendre que la thèse n'était pas une extension de moi-même et que tous les conseils et critiques devait être pris avec recul. Thierry De Meeus, merci de m'avoir aidé pour les questions en génétique des populations et de m'avoir permis de participer à la formation sur l'initiation à la génétique des populations qui m'a beaucoup aidée pour la suite. Patrick D, merci d'avoir répondu à toutes mes interrogations que ce soit sur les manips ou sur la vie du laboratoire. Olivier B, merci pour tous d'avoir pris du temps pour mettre au point une méthode pour calculer les distances hydro facilement et surtout merci de m'avoir raconté ces anecdotes sur ta thèse qui m'ont rassurée surtout sur la fin. Merci à Olivier P, pour m'avoir apporté tous les renseignements sur l'élevage de taureaux en Camargue et aussi sur l'histoire de la Tour du Valat. Merci à Nicolas B, pour ta gentillesse et ton enthousiasme.

Un immense merci aux éleveurs, Monsieur Mailhan, Bon et Blanc, aux chasseurs. Merci au directeur de l'abattoir de Tarascon Olivier Roux et aux vétérinaires (et employés de l'abattoir de Tarascon et de Pézenas qui ont accepté de collaborer à cette étude et nous ont renseignés et aidés. Ce travail n'aurait pas pu être possible sans eux.

J'aimerais remercier aussi l'équipe EPID d'ONIRIS qui m'a accueillie pendant 3 jours et avec qui j'ai pu avoir de nombreuses discussions très enrichissantes. Et plus particulièrement, merci à Christophe Chartier qui m'a accordé du temps pour m'expliquer le diagnostic et la détection des strongles et des paramphistomes.

Merci au labex CEMEB qui a financé pour moitié cette thèse, ainsi que ma participation à plusieurs colloques et formations, et toutes mes manips pendant ces trois ans.

Viennent ensuite tous ceux qui m'ont supportée au bureau, à la pause-café, à la cantine

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de MIVEGEC à commencer par Frédéric Simard. Merci de m'avoir accueillie dans l'unité. Merci à Céline, Eve, Mircea, Christine, Anne et toutes les personnes du bâtiment Paire de l'IRD.

Les milliers d'escargots et de douves échantillonnés mais aussi plusieurs centaines de PCR et génotypages n'auraient pu l'être sans l'aide de tous les stagiaires que j'ai co-encadrés pendant ces trois ans. Eric, Sarah, Stephen, Céline, Michel, vous m'avez grandement facilité le travail, et les journées au bureau et sur le terrain étaient beaucoup plus joyeuses en votre compagnie.

Un grand merci à Pili, pour l'aide immense que tu m'as apportée sur la review, toujours disponible et réactive. Mais surtout de m'avoir permis de venir avec toi et Jean-Pierre en Argentine pour faire du terrain. Ce voyage aura été très enrichissant d'un point de vue scientifique mais aussi humain.

Merci à Jean-Pierre, pour toutes ces anecdotes pendant ce voyage en Argentine, et cette passion pour les mollusques que tu nous as transmis pendant tout le long. Depuis, dès que je vois une mare ou une rivière, je m'arrête pour chercher des mollusques.

Un grand merci à Manon, car c'est en grande partie grâce à toi que j'ai eu cette thèse. Tu m'as donnée beaucoup de ton temps quand j'étais en stage alors que tu étais en train d'écrire ta thèse, et je me rends compte maintenant que ce temps est très précieux. Et durant, toute ma thèse, tu as toujours été là pour discuter avec moi, du perso comme de mes résultats.

Merci à Antonio Vasquez Perera, d'avoir participé à la rédaction de mon premier article mais aussi pour ces discussions sur l'élevage de limnées et la récupération des œufs de douves.

Daniel, merci de me rappeler tous les jours que je suis une hippie, d'avoir été là pour me soutenir et pour toutes nos discussions autour du bassin.

Margaux, ma compatriote de thèse mais bien plus que ça, une amie toujours présente. Plein de bon souvenir ensemble, que ce soit Barcelone et l'Irlande avec Camille, ces petits restos toutes les deux ou encore ces samedis à travailler dans des cafés.

Merci à l'équipe du manger de l'IRD, Davy, Anais B, Anais A, David, Angélique, Louis, Adeline, merci pour toutes ces moments passés ensemble.

Merci à tous les membres de la Tour du Valat, ainsi que de Wetland international, de TAKH et de l'ONCFS. Les gens de la tour, Florence, Marie, Marie Antoinette, Jocelyn et tous les autres salariés qui m'ont accueillie et qui ont su être toujours disponibles au moindre problème. Merci aux services civiques et aux stagiaires survivants qui ont essayé de me remonter le moral après la perte de mon travail.

Un grand merci à Thomas, Carole et Emilie, pour le coup de main pour le terrain. Merci à Thomas d'avoir sauvé mes bottes de la boue et de t'être si souvent moqué de moi, c'était de bonne guerre. Merci à toi, Carole, d'avoir été une service civique en or, de m'avoir aidée à échantillonner les bouses de vaches et surtout à découper ce qu'on

pensait être la caillette, deux jours de manip entourés de mouches pour au final n'avoir aucun parasite mais malgré ça tu as toujours gardé le sourire.

Je remercie les thésards de la Tour du Valat, Antoine, mon super colocataire de chambrée, merci de m'avoir fait rire et de m'avoir écoutée. Et 'c'est toujours chouette de prendre un peu part à la conservation de cette espèce ' . Elie, on peut dire qu'on est des survivants. Merci d'avoir essayé de me sortir de ma chambre même si c'était souvent compliqué. Benjamin, heureuse coïncidence de se retrouver deux ans après le master pour faire notre thèse au même endroit, tes brèfs passages à la Tour du Valat ont toujours été source de rire. Manon, merci pour ces pauses cafés et ces moments passés ensemble et de m'avoir aidée à supporter ces derniers mois. Et j'en suis sure tu feras une très grande thèse. Et Léo, le postdoc, il existe des bons chasseurs et des mauvais chasseurs, je ne dirais pas dans quelle catégorie tu es, je sais que tu peux être susceptible. En tout cas, un grand merci pour tes plaintes, tes chasses infructueuses, ton racket de gâteaux, tes don't worry avec ton french accent mais surtout pour tes dessins de papillons qui m'ont aidée à ne pas décomprésser.

Merci aux copains copines censuré(e)s. Merci pour tous ces moments partagés depuis des années, pour ce soutien lors des moments difficiles. J'espère qu'on va pouvoir fêter ma liberté rapidement. En particulier, j'aimerais remercier Clarisse, pour tous ces coups de téléphone qui m'ont donné du baume au cœur et Flo, merci pour être un super informaticien et mon super BFF même si tu n'as pas réussi cette fois-ci à récupérer mes données.

Un grand merci à ma sœur, May, tu m'as toujours encouragée, poussée à sortir de ma zone de confort et à prendre confiance en moi. Hâte de te retrouver pour ces journées pyjamas, série et pisse mémères.

Merci à tous les colocs qui sont passés dans ma vie, Juliette, Salomé, Rebecca, Florian, Valentin, Alice, Anaïs. Mais plus particulièrement, j'aimerais remercier Florian et Valentin, vous êtes des supers colocs, merci de m'avoir aidé à décompresser, ces derniers mois mais surtout de m'avoir supportée.

Axel, maintenant on peut dire qu'on est copains si tu es dans mes remerciements. Je te remercie pour ton enthousiasme, ta bienveillance, pour toutes nos conversations où on a refait le monde, ces jeux de sociétés et ces promenades aux bords du Lez. Tu m'as souvent permis de relativiser.

A mes parents qui m'ont toujours soutenue dans mes études, merci du fond du cœur d'être là. Et je sais que vous me soutiendrez encore dans mes choix à venir.

A Maxime, mon pilier pendant ces trois ans, ma bouffée d'oxygène, tu m'as toujours encouragée et soutenue même quand je voulais tout arrêter, merci d'être là pour moi à chaque instant.

A mes grands-parents,

Table des matières

Introduction 12

I. **Les parasites, acteurs majeurs des écosystèmes ou ennemi de l'Homme** 13

I.1. Le rôle des parasites dans les écosystèmes 14

I.2. Les perturbations anthropiques à l'origine de l'émergence et de la réémergence 19

I.3. Mollusques et trématodes, des interactions anciennes en plein bouleversement . 21

II. **La fasciolose, une maladie négligée réémergente** 25

III. **La Camargue : laboratoire d'étude de la dynamique de la fasciolose** 29

IV. **Objectif et problématique de la thèse** 31

Chapitre 1 : Dynamique de population de *Galba truncatula* en Camargue 38

I. **Caractérisation de l'habitat des limnées et la prévalence de *F.hepatica* chez l'hôte intermédiaire *Galba truncatula*** 40

II. **Permanence de la mise en eau des habitats : Quels impacts sur la structuration génétique de *Galba truncatula ?*** 45

III. **Connexion des habitats : Impacts sur la dispersion des limnées.** 49

Chapitre 2 : Dynamique de population de *Fasciola hepatica* dans la faune sauvage et domestique en Camargue 54

I. **Les risques associés à la transmission de la fasciolose** 58

II. **Effets de la grande douve du foie sur la condition corporelle du bétail** 60

III. **Dynamique de la douve au sein de la manade non traitée** 65

IV. **Dynamique de la douve entre des troupeaux traités et non traités** 67

V. **Les échanges entre la faune sauvage et domestique** 70

Discussion générale 76

I. **Une nouvelle approche, la gestion intégrée adaptative** 77

I.1. Une surveillance accrue pour éviter 77

I.2. La prévention du risque de la fasciolose 79

I.3. Une utilisation des traitements non systématique 81

I.4. Travailler ensemble pour une meilleure gestion 81

II. **Connaître les activités humaines du passé pour préparer l'avenir** 83

II.1. Les modifications des pratiques d'élevages 83

II.2. Les modifications dans les communautés 84

II.3. Les modifications de l'utilisation des terres 86

III. **La Camargue, une région en constante évolution** 87

IV. **Conclusion : une nouvelle approche des maladies parasitaires, travailler à la réduction des impacts plutôt qu'à l'éradication** 88

Bibliographie : 90

Article 1 118

Article 2 134

Article 3 160

Annexe 185

Glossaire : 252

Liste des Annexes:

Annexe 1 : Article 4 : Vázquez A, Alda P, Lounnas M, Sabourin S, Alba A , Pointier JP, Hurtrez-Boussès S. Lymnaeid snails hosts of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (Trematoda: Digenea) worldwide: a practical review……186

Annexe 2 : Article 5 : Alba A, Vázquez A, Sánchez J, Duval D, Hernández M; Sabourin E, Hurtez-Boussés S, Gourbal B. *Phenotype characterization of naturally-resistant and susceptible Pseudosuccinea columella populations to Fasciola hepatica from Cuba*……...226

Annexe 3 : Focus……..248

Annexe 4 : Communications orales ……251

Introduction

I. Les parasites, acteurs majeurs des écosystèmes ou ennemi de l'Homme

Parasite : être vivant qui retire de l'énergie d'un autre organisme (**hôte**) sans pour autant que l'hôte soit mort, soit une proie ou qu'il en retire lui-même un quelconque avantage (Combes, 2018) ou encore être vivant qui vit sur ou dans un autre organisme et lui cause un certain nombre de dommages (Price, 1980) (Encadré 1).

Lorsqu'on entend parler de parasite, la première pensée n'est jamais très bonne. Dans l'histoire, les parasites, qu'il s'agisse de bactéries, de virus ou d' organismes multicellulaires, tels que les poux ou les puces ont été responsables de nombreuses épidémies chez l'Homme, mais aussi chez les animaux domestiques et les plantes cultivées, entraînant un impact négatif important sur la santé et l'économie (Gallup and Sachs, 2001; Gazzinelli et al., 2012). Le parasitisme est une contrainte universelle. Les interactions hôtes parasites concernent tous les êtres vivants (Price 1980), il n'existe pas d'organisme qui ne soit pas engagé dans un système parasité, soit en tant qu'hôte, soit en tant que parasite, voire les deux à la fois.

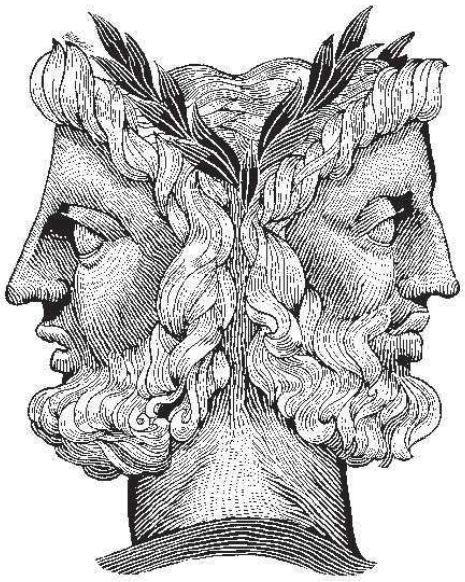


Figure 1 : Représentation de Janus, divinité ayant deux faces, l'une sombre et l'autre positive. On pourrait visualiser les parasites de la même manière, leur côté sombre en vivant aux dépens de l'hôte pouvant induire des coûts importants et leur côté positif avec leur rôle dans l'évolution du vivant et des **écosystèmes**.

Encadré 1 : Les parasites

Le terme parasite employé ici comprend l'ensemble des organismes adoptant ce mode de vie qui peut être obligatoire ou occasionnel (cas des bactéries opportunistes).

Il peut être difficile de classer les parasites. C'est pourquoi, au sein de l'immense diversité des parasites, les classifications sont généralement basées sur les types d'adaptations à ce mode de vie particulier.
Même si elles peuvent paraître artificielles et très diversifiés, ces catégories permettent de définir les caractéristiques écologiques des parasites (mode de transmission, virulence etc) qui sont des déterminants épidémiologiques important pour la compréhension d'une maladie (Hurtrez-Boussès., 2000). Les parasites peuvent être classés par les traits suivants:

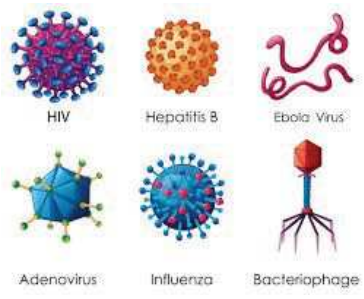
– Taille du parasite : Microparasites (Virus, bactéries, eucaryotes pluricellulaires)/ Macroparasites (Eucaryotes pluricellulaires).
Au-delà de l'aspect purement descriptif, cette distinction a une grande importance en dynamique des populations. En effet, les microparasites sont caractérisés, contrairement aux macroparasites, par des cycles de vie très courts (par rapport à ceux de leurs hôtes), par une production de descendants très élevée. La réponse immunitaire de l'hôte est très souvent spécifique. Ces distinctions permettent d'élaborer deux grands types de modèles de dynamique des populations hôtes et parasites et ont donc une grande importance en épidémiologie (voir Morand et Deter 2007).

– Localisation du parasite par rapport à l'hôte : ectoparasites (à l'extérieur de l'organisme) /endoparasites (dans le milieu intérieur) / mésoparasites (dans le milieu encore, ces distinctions permettent de mieux comprendre les modes de transmission et les types de défenses de l'hôte (immunitaire spécifique ou non, comportementale).

– Nature et importance des ressources drainées (chez les végétaux): holo-parasite (le parasite utilise la sève élaborée de son hôte) / hémi-parasite (le parasite est photosynthétique et n'utilise que la sève brute de son hôte). Ces types de parasitisme conditionnent l'impact sur l'hôte. L'étude des relations phylogénétiques entre les taxons holo et hémi-parasites apporte de plus un éclairage sur l'évolution du parasitisme (voir par exemple Bennett et Matthews 2006 sur le groupe des Orobanchaceae).

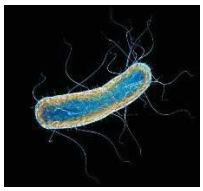
– Types de cycles : direct (une seule espèce hôte) /indirect (passage par plusieurs hôtes). La complexité des cycles est en relation avec les modes de transmission (Thomas et al. 2010).

– Phase du cycle de vie qui est parasite : parasites protéliens (seule la phase larvaire est parasite) / seule la phase adulte est parasite / organismes parasites durant toute leur vie. Cette caractéristique a notamment des conséquences sur la dispersion.











I.1 Le rôle des parasites dans les écosystèmes

Par définition, les parasites sont des exploiteurs car ils vivent au détriment de leurs hôtes, qui leur fournissent le gîte, le couvert et le lieu de multiplication (Price 1980), mais des recherches récentes montrent le rôle majeur qu'ils jouent comme catalyseurs (Figure 1). Par exemple, ils jouent un rôle important dans l'évolution de l'immunité de l'hôte, notamment à travers leurs interactions avec le complexe majeur d'histocompatibilité (Kamath et al., 2014). De plus, dans les populations humaines, la théorie hygiéniste suggère que la diminution des **infections** liées aux **agents pathogènes** grâce aux nouveaux moyens de lutte contre les maladies et au développement de l'hygiène a conduit, dans les pays développés, à une forte augmentation de la fréquence des allergies et des maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1 et la sclérose en plaques (Okada et al., 2010; Rook, 2009; Yazdanbakhsh et al., 2002). Une autre étude a montré qu'en Amérique, les Afro-Américains sont plus exposés au risque de cancers et maladies auto-immunes que les personnes de type caucasien car ils ne subissent plus régulièrement des infections par des helminthes sous la pression desquelles leur système immunitaire a évolué. Cette absence d'infections entraîne pour certains d'entre eux un dysfonctionnement à l'origine de différentes maladies dont des cancers (Jacqueline et al., 2017). Ainsi, l'éradication de certains agents pathogènes, notamment ceux qui ont coévolué avec nous, peut avoir des conséquences sur notre vulnérabilité ou notre **résistance** face à diverses maladies.

Bien que le parasitisme induise des coûts directs sur la condition physique et sur les **traits d'histoire de vie** de l'hôte, dans certaines situations, l'infection peut indirectement entraîner des avantages sur la condition physique qui dépassent ces coûts directs (Thomas et al., 2000). Dans le cas de l'immunité croisée, l'infection par un parasite de **pathogénicité** faible peut protéger les hôtes d'autres pathogènes, apparentés ou non, de virulence plus forte (Cox, 2001). Par exemple, la présence de la bactérie Wolbachia chez les drosophiles peut avoir un effet protecteur contre certains virus (Hedges et al., 2008).

Depuis quelques années, de nouvelles thérapies impliquant des helminthes, sont en cours de développement pour lutter contre des maladies auto-immunes. Par exemple, l'introduction des trichures (*Trichuris suis*) est testée pour réguler la réponse immunitaire de patients atteints de la maladie de Crohn (Summers et al., 2005). Il a aussi été montré que certains helminthes intestinaux peuvent **bioaccumuler** des métaux lourds, permettant

l'élimination de quantités importantes de contaminants des tissus de l'hôte (Pascual and Abollo, 2005; Sures, 2004, 2003).

Certains chercheurs tentent de domestiquer les virus pour s'en servir comme médicament afin de les utiliser contre le cancer : la stratégie consiste à atténuer un virus pour qu'il puisse se répliquer seulement dans les cellules cancéreuses (Bourke et al., 2011; Tedcastle et al., 2012). De même, l'utilisation des phages, virus attaquant spécifiquement certaines bactéries, est mise en œuvre par certains pays comme alternative aux antibiotiques dans le contrôle des infections bactériennes (Ravat et al., 2015; Wittebole et al., 2014).

Il a aussi été mis en lumière que les parasites peuvent avoir une importance fonctionnelle dans les écosystèmes à différentes échelles spatiales et temporelles (Cleaveland et al., 2001). Ils peuvent en effet contribuer aux efforts de conservation en fournissant des informations sur l'état de ces **écosystèmes**. En raison de leur rôle dans les **réseaux trophiques**, les parasites peuvent notamment être des indicateurs de la structure des réseaux alimentaires (Lafferty et al., 2006; Marcogliese, 2004). Par exemple, les parasites constituent une grande partie de la biomasse dans la plupart des écosystèmes et peuvent être responsables de 78 % des interactions dans certains réseaux trophiques (Lafferty et al., 2006). Ils peuvent également être des indicateurs efficaces du stress environnemental, du bon état des réseaux trophiques et de la biodiversité (Marcogliese, 2005). Des études, se sont servies des parasites comme bio indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques (Palm and Rückert, 2009; Sasal et al., 2007). Plusieurs travaux sur les parasites de poissons ont montré que les populations parasitaires peuvent augmenter ou diminuer lorsqu'elles sont confrontées à des changements environnementaux, en fonction à la fois de leur cycle de vie et de la nature du changement. Les facteurs de stress environnementaux, tels que les eaux usées ou les polluants industriels, peuvent entraîner une modification dans la communauté de parasites (Mackenzie et al., 1995; Snieszko, 1974).

L'étude des parasites peut également faire la lumière sur l'évolution de l'hôte et sa démographie, son histoire géographique (Nieberding and Olivieri, 2007), ses schémas migratoires (Killingley, 1980) et aider à identifier les origines de l'hôte (Harris et al., 2013). Une étude sur l'agent bactérien de la lèpre, *Mycobacterium leprae*, a montré que ce parasite pouvait être utilisé comme un marqueur utile pour tracer la migration des peuples et retracer les étapes menant aux populations modernes (Monot et al., 2008). Une autre étude **phylogéographique** sur *Helicobacter pylori,* bactérie gastrique humaine a

permis également de fournir une signature génétique de certaines migrations humaines majeures, comme l'introduction néolithique de l'agriculture en Europe, l'expansion des populations Bantu en Afrique ou encore la traite des esclaves (Falush et al., 2003).

Il est ainsi important de prendre en compte l'importance des parasites dans les écosystèmes et les avantages décrits plus haut qu'ils peuvent apporter à l'Homme. Actuellement, l'importance des écosystèmes tend à se mesurer au moyen des valeurs utilitaires associées, c'est-à-dire les services et bien être que les écosystèmes fournissent aux humains. C'est la notion de service écosystémique qui renvoie donc à la valeur (monétaire ou non) des écosystèmes (http://www.millenniumassessment.org/fr/Synthesis.html). Cette idée a été développée dans les années 80.

Bien que les parasites fassent entièrement partie des écosystèmes, le maintien de la biodiversité parasitaire n'a jamais été une priorité de conservation (Dunn et al., 2009; Gompper and Williams, 1998; Griffith, 2012). L'objectif de la biologie de la conservation est de maintenir la biodiversité, y compris les processus évolutifs qui l'animent et la soutiennent (Gómez et al., 2011). Or, les parasites ont un rôle majeur dans l'évolution de leurs hôtes. Ignorer la conservation des parasites, c'est donc ignorer l'état de conservation de la majorité de la vie sur Terre, car le parasitisme représente la stratégie la plus courante sur la planète (Dobson et al., 2008; Poulin and Morand, 2000). Cela signifie aussi négliger une relation biologique fondamentale, car les interactions hôte parasite jouent un rôle fondamental dans les processus écologiques et évolutifs de la diversité biologique et de l'organisation de l'écosystème (Marcogliese, 2004). Toutefois, ces « services » sont difficiles à évaluer : mesurer l'impact positif des parasites sur leurs hôtes, leurs réseaux trophiques et leurs rôles fonctionnels nécessitera probablement de nombreuses expériences pour attribuer des valeurs, monétaires ou non.

Depuis, la nuit des temps, l'Homme a toujours cherché de façon empirique à soigner les maladies, que ce soit avec l'utilisation des plantes ou des interventions chirurgicales (Halberstein, 2005; Rifkinson-Mann et al., 1988). Les premiers documents écrits sur les maladies infectieuses proviennent de la médecine égyptienne de 3000 à 400 avant Jésus-Christ ; des traces de l'utilisation de peignes à poux ont aussi été retrouvées (Mumcuoglu, 1996). D'autres descriptions proviennent de médecins grecs de 800 à 300 av J.-C et de médecins romains de 700 avant J.-C à 400 après J.-C (Simpson et al., 2002). En Europe, il faut attendre la fin du XIXe et début du XXe siècle, avec la découverte par Pasteur que

les maladies peuvent être causée par des bactéries, puis la découverte des virus par Pierre-Paul Emile Roux et les premières méthodes de prévention contre les maladies par Robert Koch (Simpson et al., 2002).

Ensuite, l'arrivée du premier antibiotique, découvert par Fleming en 1928, et seulement exploité dix ans après par une équipe américaine et anglaise, permettra de sauver des millions de personnes (*Encyclopædia Universalis*). Mais, deux ans après l'utilisation intensive de la pénicilline, des souches de Staphylocoque résistantes ont été identifiées et leur nombre n'a cessé d'augmenter (Alizon et al, 2016). La découverte d'autres antibiotiques n'a fait qu'amplifier le problème et on connaît aujourd'hui des souches multirésistantes, qui posent d'énormes problèmes en santé publique (OMS, 2000). Néanmoins, le problème de l'**émergence** de résistances ne se pose pas qu'avec les antibiotiques, mais aussi avec d'autres médicaments tels que les antihelminthiques ou les antiviraux. Avec l'**épidémie** de Sida dans les années 1980, on a vu apparaître des résistances chez le virus du VIH qui est capable de muter rapidement ; les premiers médicaments antiviraux développés sont devenus inefficaces et il a fallu mettre en place des trithérapies, voire des multi-thérapies pour contrer les résistances (OMS, 2012).

Malgré ce que les scientifiques pensaient au début du 20^{e} siècle, et ce que disait Pasteur : "Il est dans le pouvoir de l'Homme d'éradiquer l'infection de la Terre". Seul un très petit nombre de parasites ont été éradiqués par l'Homme à ce jour, notamment grâce aux vaccins. On peut citer la variole, éradiquée en 1980 (Breman and Arita, 1980) ou encore la peste bovine en 2011 (OIE, 2011). Il est important de continuer à lutter contre des maladies ayant des impacts importants sur la santé humaine et animale. Toutefois, il est crucial de se poser les bonnes questions sur les moyens mis en place, notamment afin d'éviter d'engendrer des problèmes de résistance et pour limiter les conséquences négatives sur la biodiversité des programmes de lutte. Pour cela, il faut appréhender le système dans son ensemble et bien faire la distinction entre la présence d'un parasite dans un écosystème (l'aléa) et le risque, qui est dépendant du contexte, que la maladie représente pour l'Homme (Hosseini et al., 2017).

Il existe un lien très étroit entre l'hôte et le parasite, qui peut être rapidement modifié et qui est très sensible aux perturbations. Ainsi, Emile Duclaux en 1882 a proposé une nouvelle approche intégrative, l'épidémiologie. Il ne considère plus que c'est l'apparition d'un micro-organisme qui engendre une épidémie mais que, très souvent, c'est la

perturbation de l'équilibre entre l'agent pathogène et ses hôtes naturels qui fait naître l'épidémie (Guegan et al., 2008).

I.2 Les perturbations anthropiques à l'origine de l'émergence et de la réémergence

Le monde connaît depuis ces cent dernières années, une nouvelle ère « d'émergence des maladies infectieuses » (Jones et al., 2008; Taylor et al., 2001). La **prévalence** et l'impact des maladies transmissibles sur nos sociétés avaient fortement diminué dans la période de l'après-guerre, grâce notamment à l'introduction massive de la vaccination et des antibiotiques. Cependant, depuis ces dernières décennies, on observe, l'émergence de maladies inconnues jusqu'à une date récente (Sras, grippe aviaire, Ebola etc.) et la réémergence de maladies que l'on pensait presque éradiquées (tuberculose, choléra), ainsi que des difficultés pour enrayer certaines **pandémies** comme celle du Sida (Woolhouse and Gowtage-Sequeria, 2005; World Health Organization, 2008)

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette nouvelle crise sanitaire. La responsabilité de la résistance aux antibiotiques et aux autres médicaments, rendant les différentes thérapies existantes moins efficaces, a souvent été pointée du doigt par les milieux médicaux (Alizon et al., 2016). Néanmoins, il est de plus en plus évident que cette crise est aussi liée à la modification des écosystèmes due aux perturbations anthropiques (Jones et al., 2008). En effet, aujourd'hui, l'érosion de la diversité biologique continue de s'accélérer du fait d'un nombre considérable de processus humains, tels que la mondialisation des échanges, l'anthropisation des habitats ou le réchauffement climatique. Toutes ces modifications ont un effet sur les dynamiques épidémiologiques des maladies infectieuses en créant de nouveaux contacts entre populations, en favorisant la diffusion des parasites, en concentrant les populations d'hôtes, en créant ou intensifiant des **pressions de sélection** sur les parasites et en modifiant la distribution géographique de vecteurs potentiels et/ou d'espèces **hôtes compétentes** (Budischak et al., 2015; Morse, 1995; Smith and Guégan, 2010; Wolfe et al., 2007).

Les maladies liées à l'eau sont particulièrement sensibles à ces perturbations anthropiques. En effet, les milieux aquatiques sont les plus touchés par la perturbation des écosystèmes et cette situation est en constante dégradation. On considère qu'en 2025,

plus de la moitié de la population mondiale sera confrontée au stress de l'approvisionnement en eau et/ou de la qualité de l'eau (OMS, 2018). Les besoins en eau dans le monde sont importants, qu'il s'agisse des besoins pour l'Homme, pour l'agriculture ou l'élevage. Des modifications de la gestion de l'eau et de la qualité de l'eau peuvent engendrer l'émergence de maladies (Petney and Taraschewski, 2010). Johnson and Chase (2004) ont mis en évidence une relation entre l'accroissement des activités agricoles et l'augmentation de la prévalence de malformations chez les amphibiens. Ces auteurs montrent que l'eutrophisation des eaux due aux activités agricoles bouleverse la composition des communautés d'eau douce. Cela se traduit par une modification des réseaux trophiques, qui favorise la prolifération des mollusques du genre Planorbella. Ceci profite au parasite *Ribeiroia ondatrae*, dont les planorbes sont les premiers hôtes intermédiaires.

La construction de barrages ou de système d'irrigation peut avoir également une incidence sur l'émergence ou la réémergence de certaines maladies tropicales négligées, car leur épidémiologie est liée à l'écologie des zones humides et à la gestion de l'eau. Par exemple, la construction d'un barrage peut créer des nouveaux habitats pour la survie et/ou la reproduction de vecteurs ou hôtes intermédiaires (Petney and Taraschewski, 2010; Steinmann et al., 2006). Des chercheurs ont montré que des ouvrages hydriques ont permis l'augmentation de la densité de (nouvelles) espèces vectrices, ce qui entraîne généralement une augmentation de l'incidence du paludisme (Ijumba and Lindsay, 2001), par exemple en Ethiopie (Ghebreyesus et al., 2002). Il a aussi été montré que les cas de schistosomiase augmentent souvent dans les populations vivant à proximité de grands barrages en Afrique de l'ouest (Sokolow et al., 2017; Steinmann et al., 2006). Au Laos, la construction de routes et de bassin d'aquaculture ont entraîné une recrudescence de cholangiocarcinome causé par le trématode *Opisthorchis viverrini* (Ziegler et al., 2013).

Plusieurs maladies comme le choléra ou encore la bilharziose, dans les pays en voie de développement, sont liés directement au stress hydrique. Les populations ont un accès limité aux sanitaires et n'ont souvent pas d'accès à l'eau potable, ce qui contribue à la progression rapide d'épidémies (Grimes et al., 2015; Taylor et al., 2015). Les populations humaines et les animaux domestiques sont parfois très proches ce qui entraîne la transmission de maladies zoonotiques à l'Homme via l'eau. C'est le cas des schistosomiases mais aussi de la cryptosporidiose (Huyse et al., 2009 ; Soba et al., 2008).

Beaucoup d'exemples de maladies d'origines hydriques décrites plus haut sont causées par des trématodes ; c'est le cas des schistosomiases ou de l'opisthorchiase. Les trématodoses sont présentes dans le monde entier et ont un impact important sur l'économie et la santé (Rim et al., 1994; Taylor et al., 2001). Leur transmission, essentiellement liée à l'eau ou à la nourriture, fait que ces parasites sont parmi les plus répandus dans les populations humaines et animales. Les trématodes ont des cycles de vie complexes impliquant des vertébrés comme hôtes définitifs et généralement, des mollusques comme premier **hôte intermédiaire** (Keiser and Utzinger, 2009). Les trématodes infectent plus d'un milliard de personnes dans le monde et causent plus de 600 millions **DALYs** (disability-adjusted life years) chaque année (Fürst et al., 2012; Hotez et al., 2008).

De plus, les trématodes jouent aussi un rôle important dans les réseaux trophiques. Dans des écosystèmes tels que des mares leur biomasse est comparable à celle des insectes très abondants dans ces écosystèmes comme les coléoptères, les éphéméroptères ou encore les odonates ((Preston et al., 2013). Une autre étude, en Nouvelle Zélande, a montré que le trématode *Curtuteria australis* joue un rôle sur la prédation de son hôte intermédiaire (Thomas and Poulin, 1998). En effet, l'étude suggère que les métacercaires ont un impact important sur la croissance du pied de son hôte intermédiaire empêchant son enfouissement correct dans les sédiments, il est donc plus facilement prédater.

I.3 Mollusques et trématodes, des interactions anciennes en plein bouleversement

Les mollusques et les trématodes **digènes** sont associés depuis au moins 200 millions d'années (Blair et al., 2001). En effet, les digènes ont besoin d'utiliser exclusivement les mollusques pour effectuer une partie de leur cycle, puis leur reproduction sexuée se réalise chez des hôtes vertébrés dont l'Homme.

L'interaction entre le parasite digène et son hôte intermédiaire est très étroite (Lockyer et al., 2004). Premièrement, l'attraction de la larve miracidium (ie. stade infectant) vers l'hôte intermédiaire se fait par **chimiotactisme**. Les digènes ont généralement une gamme d'hôtes intermédiaires restreinte à un groupe d'espèces phylogénétiquement proches (ie : sténoxène) voire à même une seule espèce (ie oioxène). Une fois entré dans le mollusque, le parasite l'infecte en causant des dommages importants : il envahit littéralement les glandes digestives et le système génital provoquant une castration (Gutierrez et al., 2001;

Gutiérrez et al., 2002; Sorensen and Minchella, 2001). Par exemple, le parasite *Trichobilharziaocellata* inhibe le développement du tractus reproductif de *Lymnaea stagnalis* (Schallig et al., 1991).

Les traits d'histoire de vie du mollusque en sont bouleversés : sa fécondité et sa survie sont menacées, sa fitness ou valeur sélective est diminuée de façon conséquente. Dans **la course aux armements** entre l'hôte et le parasite, des mécanismes de défense immunitaire (van der Knaap and Loker, 1990) ou de polymorphisme de compatibilité (Bouchut et al., 2008)se mettent en place chez le mollusque. En parallèle des mécanismes d'évitement du système immunitaire se mettent en place chez le parasite (Walker, 2006).

Les mollusques sont présents sur toute la planète et ils présentent souvent une grande capacité d'invasion. De plus, les écosystèmes d'eau douce sont particulièrement vulnérables aux invasions biologiques (Lodge et al., 1998). Les activités humaines liées à ces écosystèmes comme l'aquariophilie, la pêche, ou encore les balades en bateau sont des facteurs de dispersion important. Les connexions naturelles qui existent entre les rivières sont aussi des facteurs qui facilitent l'installation des mollusques (Lodge et al., 1998; Loo et al., 2007). Plusieurs familles d'escargots (Physidae, Thiaridae, Planorbidae et la Lymnaidae) ont été introduites accidentellement, en Amérique du Nord et dans beaucoup d'autres régions du monde via le marché de l'aquariophilie (Cowie and Robinson, 2003; Pointier and Augustin, 1999).

Plusieurs, espèces de mollusques sont impliquées dans la transmission de nombreuses maladies infectieuses pour l'Homme et l'animal. Des espèces jouant un rôle comme hôtes intermédiaires ont colonisé de nouvelles aires géographiques sur de très grandes distances et en très peu de temps. Par exemple *Melanoides tuberculata* qui est l'hôte intermédiaire de deux parasites zoonotiques, *Centrocestus formasanus* et *Haplochispumilio* (Pulido-Murillo et al., 2018), s'est installé sur le continent américain et dans les îles caraïbes depuis l'Asie de l'Est à partir des années 50 (Facon et al., 2003). Les mollusques d'eau douce du genre *Biomphalaria*, hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni* ont aussi envahi de façon spectaculaire les caraïbes et Madagascar. Leur introduction a posé des problèmes d'émergence de bilharzioses (Charbonnel et al., 2002).

Parmi les trématodoses dont la **réémergence** est liée, entre autres, à l'invasion récente de nouveau milieux par des mollusques dulçaquicoles, la fasciolose est celle dont la

distribution géographique est la plus large (Fürst et al., 2012). De plus, elle est aussi favorisée par certains changements de pratiques agricoles cités plus haut **(Article 1)**.

En effet, les Lymnaeidae, hôtes intermédiaires les plus courants des parasites *Fasciola* spp. n'échappent pas à la règle et plusieurs espèces représentent des menaces en termes d'invasion et de risques épidémiologiques associés. Par exemple, *Galba truncatula*, hôte majoritaire de la grande douve du foie en Europe, Afrique du Nord et Russie a récemment, au cours des dernières dizaines d'années, envahi la Cordillère des Andes au Venezuela, en Bolivie, au Pérou, au Chili et en Argentine (Pointier., 2015, **Article 4 soumis**). Cette invasion a notamment induit sur l'Altiplano bolivien, la plus forte hyperendémie de fasciolose connue au monde (Meunier et al., 2001). Un autre vecteur de la fasciolose, *Pseudosuccinea columella*, probablement originaire d'Amérique du Nord, a colonisé l'Amérique du Sud, l'Afrique, l'Europe ou encore les îles Pacifique en moins d'un siècle (**Article 5 soumis**, Lounnas et al., 2017; Pointier et al., 2007). Cette espèce fait maintenant partie des mollusques d'eau douce les plus largement répandus avec le physidé *Physa acuta* et le planorbidé *Helisoma duryi* (Pointier., 2015).

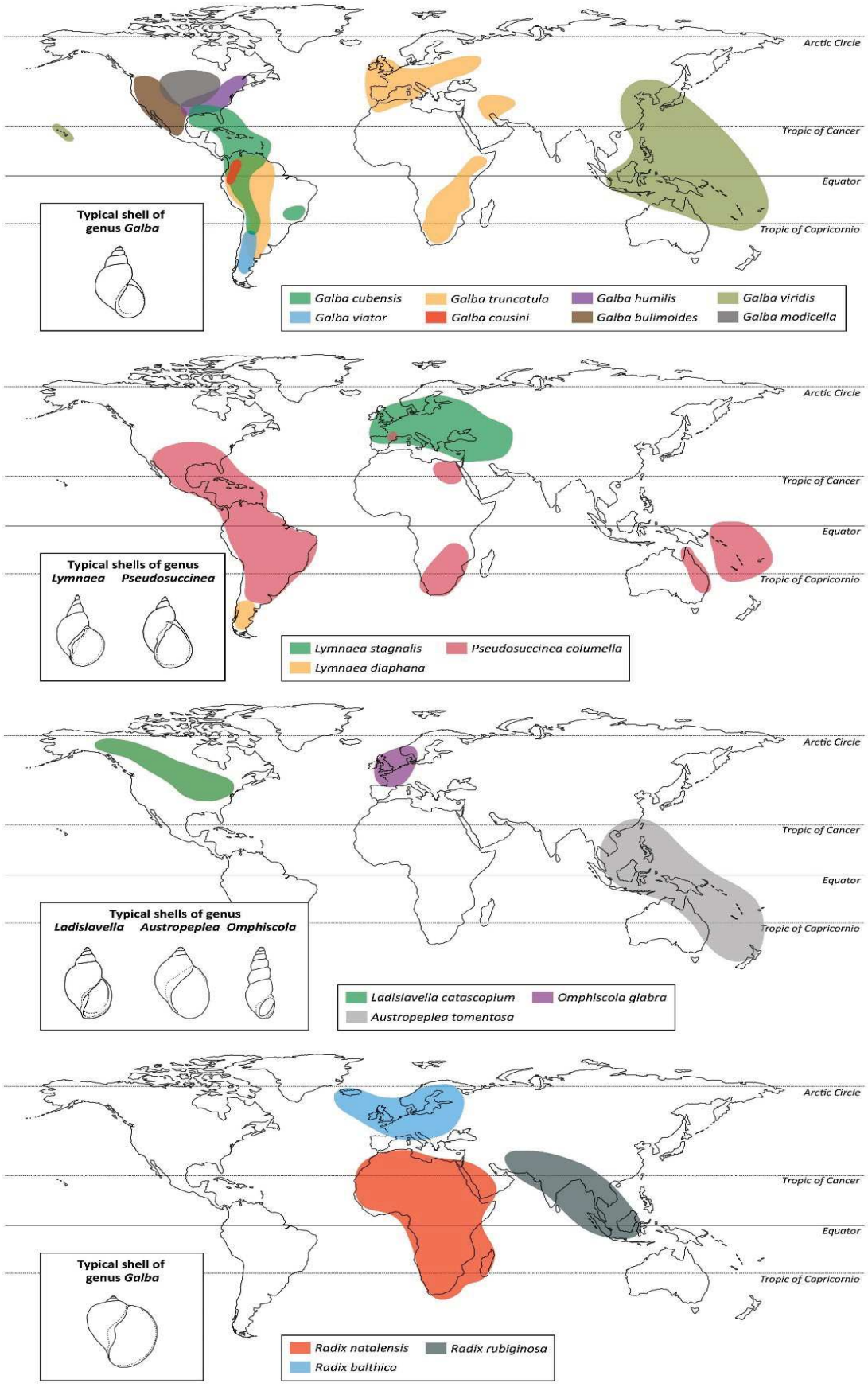


Figure 2 : Distribution des espèces les plus communes de la famille des lymnaeidae dans le monde. D'après Vázquez et al **(Article 4, soumis)**

II. La fasciolose, une maladie négligée réémergente

La fasciolose est une maladie d'origine hydrique et alimentaire causée par deux espèces de trématodes : les grandes douves du foie *Fasciola hepatica* et *Fasciola gigantica. Fasciola hepatica* a une distribution mondiale, tandis que la transmission de *F. gigantica* est limitée à certaines régions d'Afrique et d'Asie (Chen et al., 2013; Dreyfuss et al., 2005; Keyyu et al., 2005; Mekky et al., 2015; Morozova et al., 2004; Nzalawahe et al., 2015; Rojas et al., 2010; Walker et al., 2011). Il y a aussi des zones où les deux espèces de *Fasciola* spp coexistent (Ashrafi et al., 2015; Bui et al., 2015; Fentie et al., 2013). Ces parasites sont des vers plats (embranchement des **Platelminthes**) appartenant aux groupes des Trématodes Digènes. Contrairement, à la plupart des autres trématodes, qui ont une spécificité étroite vis-à-vis de leurs hôtes intermédiaires, les *Fasciola* spp. infectent une large diversité d'hôtes intermédiaires. Le cycle de vie des *Fasciola* spp. implique, en tant qu'**hôte définitif**, une très large gamme de mammifères domestiques et sauvages (moutons, bovins, chevaux, chameaux, chameaux, ragondins, lapins, Homme, etc.) (Cotruvo et al., 2004)(Figure 3). Les principales sources d'infection pour les hôtes définitifs sont les plantes associées à l'eau ou l'eau de source (Hurtrez-boussès et al., 2001). En effet, les métacercaires (c'est-à-dire les stades infectieux) peuvent s'enkyster sur les plantes aquatiques et la surface de l'eau.

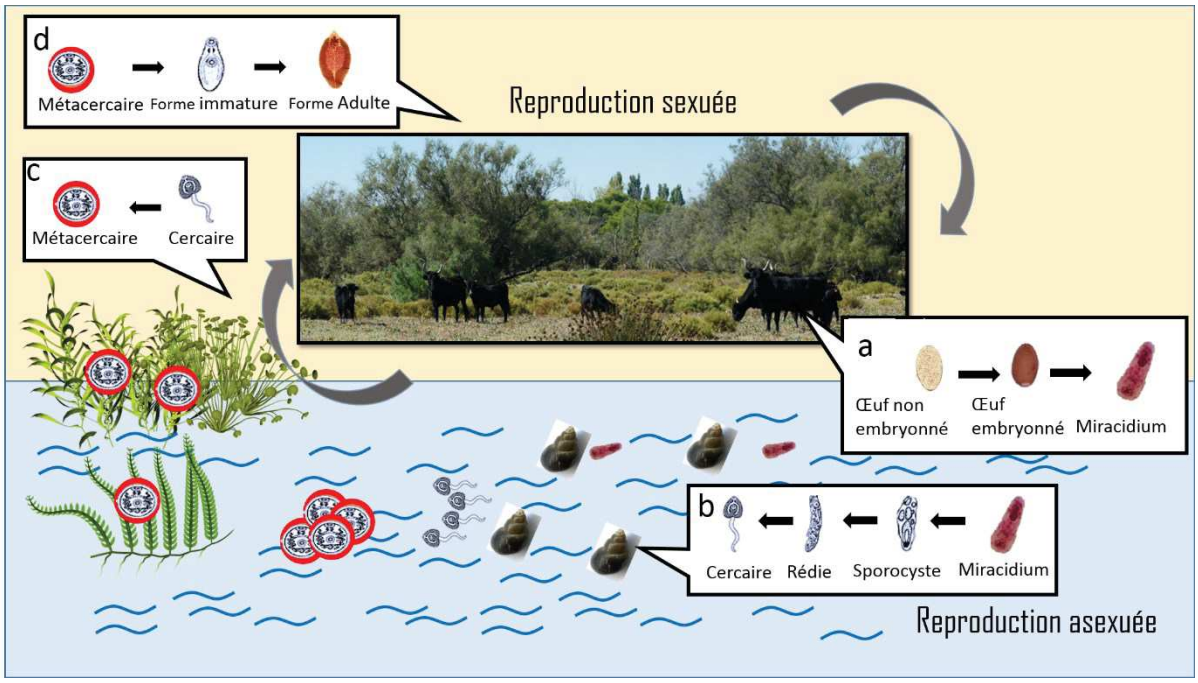


Figure 3 : Cycle de vie de *Fasciola hepatica.*

a La douve adulte se reproduit et ses œufs quittent l'hôte via les fèces ; Les œufs sont non embryonnés puis le deviennent dans l'eau. Ensuite, l'éclosion des œufs de douve donne lieu au premier stade larvaire (miracidium). b. La larve ciliée (miracidium) va rechercher activement l'hôte intermédiaire, un mollusque de la famille des Lymnaidae. Une fois entrée dans son hôte intermédiaire, la douve effectue une importante multiplication asexuée et envahit le système digestif et génital de l'hôte (400 métacercaires pour un miracidium). Lestade miracidium évolue en sporocytes, puis rédies. c. Les rédies donnent naissance à des cercaires, dernier stade larvaire. Les cercaires sortent du mollusque et s'enkystent sur des végétaux et deviennent des métacercaires (forme résistante) prêtes à être ingérées (Andrew, 1999; Hurtrez-boussès et al., 2001). d. Ingestion de métacercaires par l'hôte définitif, un vertébré. Le développement adulte de la douve commence ici. Le désenkystement donne une douve juvénile et la douve migre jusque dans les canaux biliaires. Lien pour voir le cycle dans sa version animée réalisée pendant ma thèse : https://www.youtube.com/watch?v=oUHynn4fS-s

La fasciolose est à l'origine de graves problèmes de santé publique dans plusieurs régions du monde. Elle touche principalement les personnes vivant dans la pauvreté, qui n'ont pas accès à l'eau potable, aux équipements d'assainissement adéquat et qui sont en contact étroit avec le bétail. Elle est considérée comme étant une maladie tropicale négligée (WHO, 2007). A l'heure actuelle, on estime que 17 millions de personnes sont infectées sur l'ensemble des continents (Valero et al., 2009). Cependant, ce nombre est probablement sous-estimé dans de nombreux pays, en particulier en Asie et en Afrique (Mas-Coma, 2005). Le nombre réel de cas pourrait se situer entre 35 et 72 millions de personnes, avec plus de 180 millions de personnes vivant dans des zones où il y a un risque d'infection (Nyindo and Lukambagire, 2015). Comme pour les autres maladies négligées, les fascioloses sont généralement non mortelles (au moins à court terme), cliniquement bénignes et non déclarées, mais ce sont des maladies invalidantes qui maintiennent ou augmentent la pauvreté avec 197 000 DALYs estimées (Fürst et al., 2012).

La fasciolose est également considérée comme un problème vétérinaire majeur, puisqu'elle est responsable de pertes importantes dans la capacité de production du bétail (viande et lait) (Torgerson and Claxton, 1999). Elle entraîne des pertes économiques annuelles de plus de 3 milliards de dollars US en agriculture car elle affecte des millions de ruminants dans le monde entier. Ces coûts sont en grande partie non quantifiés au niveau national ou régional, alors qu'au niveau des exploitations agricoles, il a été rapporté que la douve affecte le rendement laitier, la composition de la carcasse et prolonge le temps nécessaire pour atteindre le poids d'abattage (Johannes Charlier et al., 2014b; Howell et al., 2015). La fasiolose est actuellement en augmentation dans certains pays d'Europe, probablement en raison du changement climatique, de l'évolution des pratiques agricoles, des déplacements d'animaux et de l'utilisation des terres, et de l'émergence de résistances aux traitements, notamment à la molécule la plus utilisée, le Triclabendazole (Cwiklinski et al., 2015).

Les douves ont la capacité de proliférer dans un large éventail d'écosystèmes d'eau douce. En effet, la fasciolose est reconnue pour être la trématodose qui a la plus large distribution latitudinale et altitudinale à l'échelle mondiale (Fürst et al., 2012)(Carte 1). Cette large distribution permet d'étudier la dynamique de son parasite dans différents habitats avec divers hôtes définitifs et intermédiaires. Pourtant, cela complique grandement la lutte



contre cette maladie, car les solutions doivent être adaptées à des contextes environnementaux et socio-économiques très différents.

Carte 1 : Carte de la distribution mondiale de la fasciolose, OMS 2017

Que ce soit pour son hôte intermédiaire ou son hôte définitif, la fasciolose peut avoir un large spectre d'hôtes. Afin de l'appréhender pour la contrôler, il est crucial d'identifier les protagonistes participant au cycle pour pouvoir étudier les interactions et de comprendre l'épidémiologie de la maladie. En effet, le défi du contrôle de la fasciolose ne peut être relevé que si nous traitons en même temps, les interactions complexes entre l'environnement, les hôtes (mollusques, bétail, faune) et les activités humaines. Il est essentiel de prendre en compte tous ces facteurs, qui sont impliqués dans un monde en constante évolution (climat, fragmentation de l'habitat, pollution). Le contexte socio-économique et écologique de chaque pays, région, ville et ferme doit être pris en compte pour prévenir la fasciolose. En effet, de nombreuses études portant sur les schistosomiases et d'autres maladies tropicales négligées ont montré que l'application d'un programme de lutte intégrée, adapté et durable est la solution la plus efficace pour prévenir la **(ré)émergence** de ces maladies.

En préambule, à mon travail de thèse, j'ai tenté d'identifier les impacts des activités humaines sur la transmission de la fasciolose à travers un article de revue (**Article 1 ; publié dans Trends in Parasitology)**. En m'appuyant sur la littérature scientifique, j'ai

fait un état de l'art des connaissances existantes sur les effets des activités et des habitudes humaines sur le risque de fasciolose. Je me suis concentrée sur trois groupes d'activités qui semblent être les principaux facteurs affectant la fasciolose : i) la gestion des systèmes d'irrigation, ii) la gestion du bétail, iii) l'alimentation humaine et les habitudes hygiéniques. Pour chacune de ces activités, j'ai ensuite identifié plusieurs solutions comme des mesures préventives et des stratégies de contrôle. L''idée principale qui ressort de ce travail de synthèse est que la clé du succès de la lutte contre cette maladie réside dans l'application de programmes de lutte intégrée adaptés à chaque contexte.

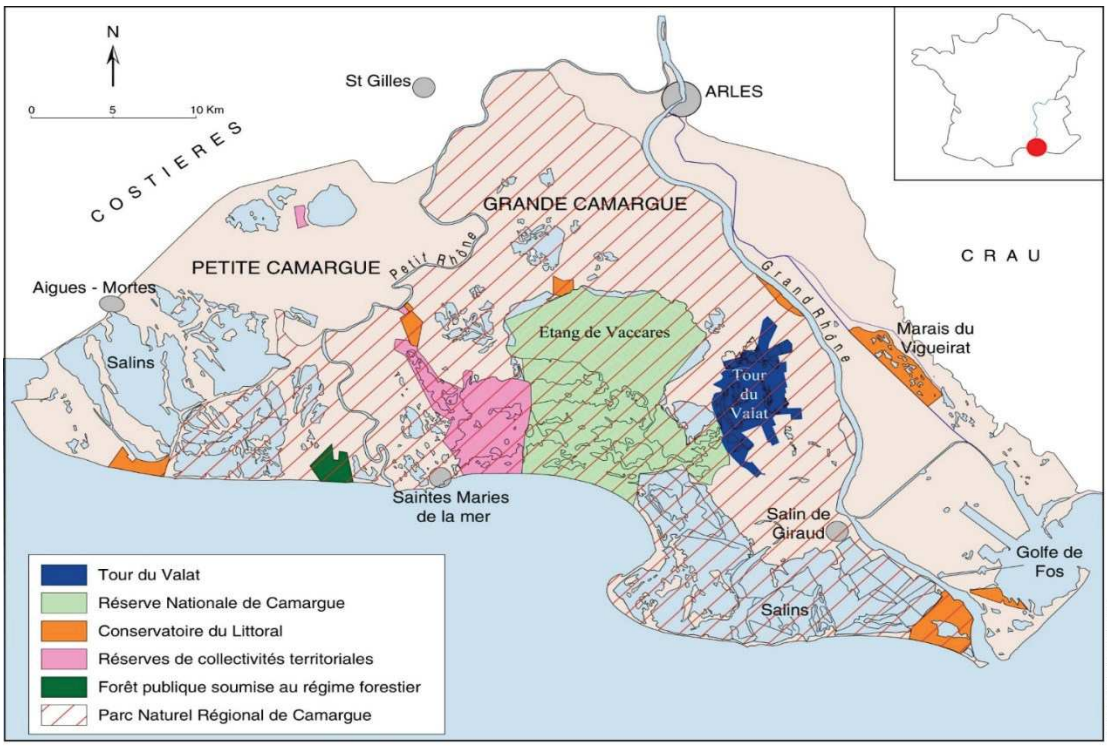
Afin de pouvoir tester cela, il est donc essentiel de trouver un site pilote, où nous pouvons avoir accès à tous les protagonistes de la maladie afin de pouvoir comprendre la dynamique de la fasciolose et essayer de proposer des moyens de lutte dans ce contexte.

III. La Camargue : laboratoire d'étude de la dynamique de la fasciolose

La fasciolose est connue comme étant présente dans l'ensemble du bassin méditerranéen, que ce soit sur la rive Nord ou la rive Sud. Dans certains pays de la rive Sud, comme l'Egypte, elle touche les populations humaines. Sur la rive Nord, elle affecte essentiellement le bétail (Curtale et al., 2005; Esteban et al., 2003; Periago et al., 2008; PNR Camargue, 2011). La zone méditerranéenne apparaît particulièrement vulnérable aux changements globaux avec notamment une forte pollution des sols et de l'eau, l'impact important du changement climatique qui entraîne une diminution des précipitations et l'aridification du climat Méditerranéen, la fragmentation des habitats avec l'augmentation de l'urbanisation et le changement de l'utilisation des sols (Observatoire des Zones Humides Méditerranéennes, 2014). De plus, d'ici 2050, les situations de pénurie d'eau en Méditerranée devraient s'accroître et les disparités entre les rives s'exacerber (Plan bleu, 2012). C'est un territoire en pleine mutation mais qui est aussi reconnu comme un point chaud de biodiversité. La zone méditerranéenne se prête donc très bien aux questionnements sur la préservation des systèmes écologiques et les risques épidémiologiques (Vittecoq, 2012).

En particulier, le territoire camarguais (Carte 2), vaste zone humide de 150000 km2 située au niveau du delta du Rhône, est très pertinent pour tester ces problèmes. C'est une des régions où les risques d'émergence sont très élevés (Vittecoq et al., 2014), les zones

humides étant les plus sensibles du point de vue épidémiologique (Jones, 1990). En effet, la Camargue est composée d'une véritable mosaïque d'écosystèmes, fluctuants dans le temps (marais, sansouïres, étangs, canaux, rizières, bois, salins, etc.). Elle est aussi fortement anthropisée (notamment par la gestion des entrées d'eaux douces). Les contacts entre populations humaines, faune domestique et faune sauvage y sont très courants entraînant des risques d'émergence élevés. De plus, la Camargue est particulièrement exposée aux invasions biologiques : 39 espèces (17 végétales et 22 animales) y sont reconnues comme envahissantes (Costa, 2005). Parmi celles-ci, plusieurs sont des réservoirs de zoonoses pouvant se transmettre à l'Homme (fasciolose et leptospirose pour le ragondin ; giardiase et cryptospordiose pour le rat musqué etc). Enfin, à l'instar des régions où l'élevage des bovins ou des ovins est important, la Camargue est décrite comme une région où la fasciolose sévit notablement (18% de foies de taureaux camarguais saisis aux abattoirs d'Arles (PNR Camargue, 2011). La maladie est donc considérée comme « à surveiller » et les éleveurs sont encouragés à traiter contre ce parasite. La Camargue allie donc plusieurs caractéristiques faisant de cette région, un site de choix pour étudier la dynamique de *F. hepatica* chez son hôte intermédiaire et ses hôtes définitifs.

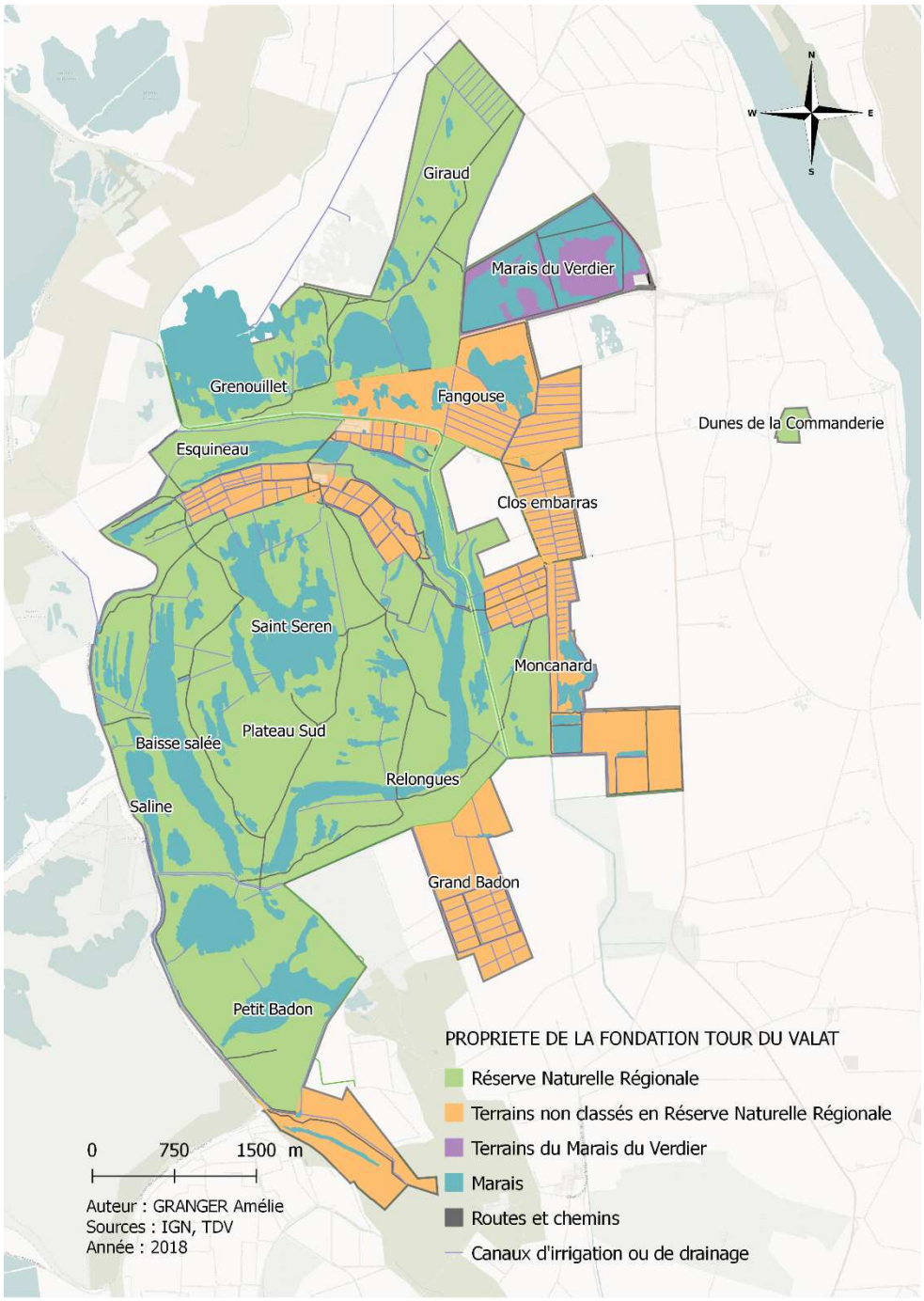


La Tour du Valat parmi les espaces protégés camarguais

Carte 2 : Carte de Camargue

IV. Objectif et problématique de la thèse

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'étudier la dynamique de la fasciolose au sein d'un territoire restreint, dans lequel nous pouvons simultanément suivre l'hôte intermédiaire, caractériser les habitats et échantillonner les parasites chez les hôtes définitifs et intermédiaires, afin de mieux comprendre l'épidémiologie de la fasciolose, de mieux cerner les risques d'émergence et les moyens d'y faire face. Ce territoire a donc été choisi en Camargue, sur le domaine de la Tour du Valat (Carte 3), qui couvre 2600 hectares. Le domaine comporte tous les habitats naturels représentatifs de la Camargue, avec un réseau de drainage et d'irrigation dense et une grande biodiversité d'oiseaux migrateurs, de mollusques mais aussi de mammifères sauvages comme le ragondin et le sanglier. De plus, quatre manades de taureaux pâturent sur le domaine, toute l'année : la manade de la Tour du Valat, dont les animaux ne sont pas traités aux antihelminthiques et les manades Blanc, Bon et Mailhan qui traitent les taureaux une fois par an.



Carte 3 : Carte du domaine de la Tour du Valat.

Nous avons donc dans cette étude réalisé un suivi de la grande douve du foie, de son hôte intermédiaire de prédilection, *Galba truncatula,* et de ses hôtes définitifs sauvages et domestiques, traités et non traités.

Deux axes de recherches ont découlé de cet objectif principal.

- Premièrement, je me suis intéressée à l'écologie et à la dynamique de l'hôte intermédiaire, *Galba truncatula* appelée communément limnée tronquée. Dans ce premier axe (chapitre I), je me suis posée plusieurs questions **(Article 2, en prep)** :

1. Quelle est l'écologie de l'habitat des limnées ?
2. Permanence de la mise en eau des habitats : Quels impacts sur la structuration génétique de *Galba truncatula ?*
3. Est-ce que la connexion entre les habitats a un effet sur la structure des populations de limnées et sur leurs dispersions ?

- Deuxièmement, je me suis penchée sur la dynamique et la circulation du parasite au sein et entre les différents hôtes définitifs **(Article 3, en prep)**. Dans cet axe (Chapitre 2), je me suis interrogée sur les questions suivantes :

1. A quoi est associé le risque d'infection ?
2. La fasciolose a-t-elle un effet sur la santé des bovins non traités ?
3. La dynamique de la douve chez les bovins est-elle différente selon s'ils sont traités ou non ?
4. Existe-il un brassage entre douves de la faune sauvage et douves des animaux domestiques ?

Ces deux parties sont complémentaires et permettront de mieux comprendre le système douve-limnée en Camargue afin de suggérer des préconisations pratiques d'élevage (zones à risque où les troupeaux ne devraient pas aller, gestion des niveaux d'eau ou des traitements etc.).

Nous avons utilisé pour répondre à ces questions, la génétique des populations (Encadré 2). Cette discipline permet de rendre compte de l'évolution des populations. Les **allèles** apparaissent par **mutations** et sont soumis ensuite à différentes **forces évolutives**, telles

que la **sélection naturelle**, la **migration** entre populations, ou la **dérive génétique**. La génétique des populations permet, à l'aide de marqueurs génétiques, d'obtenir une « image » instantanée de la variabilité entre individus au sein des populations et entre populations. Nous utiliserons ici, des marqueurs microsatellites, qui ont l'intérêt d'être très polymorphes (forts taux de mutation) et neutres (non soumis directement à la sélection). Grâce à ces marqueurs moléculaires, des paramètres épidémiologiques importants tels que la structure de la population et le système de reproduction des hôtes et des parasites, peuvent être connus indirectement.

Encadré 2 : La génétique des populations

1. Statistiques de Wright.

Les statistiques de Wright (1951), est une approche statistique permettant de décrire la répartition de la variance génétique dans une population sous divisée et entre sous-populations. Cette approche est basée sur trois paramètres : Fis, Fst, Fit.

Ces trois paramètres permettent de mesurer le déficit en hétérozygotie à différents niveaux hiérarchiques ; autrement dit ces statistiques sont une mesure du degré de la consanguinité entre allèles à diffèrent niveaux.

Fis est donc un paramètre de la population qui mesure la consanguinité entre individus, due à l'union non aléatoire des gamètes au sein de chaque sous-population. On l'appelle aussi l'indice de fixation (F) des individus dans les sous populations (s) ou déficit en hétérozygotes.

$$Fis = \frac{He - Ho}{He} = 1 - \frac{Ho}{He}$$

Fis représente donc le ratio d'hétérozygotie attendue (He) en plus ou en moins observé par rapport à l'hétérozygotie attendue (He) sous les hypothèses de Hardy-Weinberg.

Fis proche de 1 = Déficit en hétérozygotie

Fis proche de 0 = Excès en hétérozygotie

A partir du Fis, le taux d'**autofécondation** peut être estimé.

$$s = \frac{2Fis}{1 + Fis}$$

Le Fst correspond à la consanguinité entre individus d'une même sous-population relativement à la consanguinité entre sous-populations de la population totale. Il mesure l'effet wahlund (ou structuration des populations), c'est-à-dire la part d'homozygotie des individus de la population totale (indice T) provenant de la subdivision de ces derniers en sous-populations de tailles limités (indice S), on dit aussi qu'il mesure la différentiation génétique entre sous-populations.

$$Fst = \frac{HT - Ho}{HT}$$

Fst proche de 0 = pas de structuration

Fst proche de 1 = Différenciation des populations entre elles.

Fit est une mesure de la consanguinité dans la population totale qui résulte des deux phénomènes cités ci-dessus, en considérant les fréquences alléliques des individus au sein de la population.

$$Fit = \frac{HT - HI}{HT}$$

Avec Hs, l'estimateur non biaisé de la **diversité génétique** de Nei (Nei et Chesser. 1983)

Le FIT, tout comme le FIS varie entre -1 et 1. Si FIT = -1 il y a un excès total en homozygotes, si FIT = 1 il y a un déficit total en homozygotes.
Les trois indices sont liés par : (1-FIT) = (1-FIS)/(1-FST)
Si toutes les populations sont à l'EHW, FIS =0 et FIT = FST. Pour les locus multialléliques, on utilise une généralisation du FST qui est le GST de Nei.

2. Ecart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (EHW)

L'écart à l'EHW se mesure par la quantification des hétérozygotes par rapport au nombre d'hétérozygotes attendus si la population était à l'EHW.
Dans le cas où on retrouve un déficit en hétérozygotes par rapport à l'EHW on peut supposer un effet Walhund (i.e. sous-structuration non détectée lors de l'échantillonnage), une sélection contre
les hétérozygotes, une tendance à l'homogamie, au croisement entre apparentés voire à l'autofécondation.
Dans le cas où on retrouve un excès en hétérozygotes, on peut suspecter de l'hétérosis (ou vigueur
hybride), de la sur-dominance (si l'excès ne porte que sur un locus) ou encore de l'hétérogamie

Chapitre 1 : Dynamique de population de *Galba truncatula* en Camargue

Ce chapitre s'articule autour de la compréhension de la dynamique des populations de *Galba truncatula* en Camargue. Le but de cette partie est donc d'étudier l'écologie et la génétique des populations de *Galba truncatula* afin de mieux comprendre et finalement prévenir les risques de transmission de fasciolose **(Article 1)**.

Afin d'avoir une vision complète, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques des habitats des limnées et aux relations entre les caractéristiques de ces habitats et la structure des populations, abordée grâce à l'étude de la génétique des populations.

Pour cela, les mollusques ont été récoltés par chasse à vue dans leurs habitats naturels : berges des roubines (terme local utilisé pour désigner les canaux d'irrigation et de drainage) et des mares lors de différentes campagnes échantillonnage entre 2014 et 2017 (Figure 4). Un total de 2139 limnées a été collecté dans 12 sites sur le domaine de la Tour du Valat. Un site représente une zone précise sur le domaine. Au sein de chaque site, plusieurs prospections et points d'échantillonnages ont été réalisés. On appellera population, l'ensemble des mollusques collectés à un point d'échantillonnage. Afin de prévenir un effet Walhund éventuel, chaque population a été collectée sur une très petite surface (moins de 2 m le long de la berge). Au total, 168 populations ont été récoltées. Les sites de prélèvements ont été référencés par GPS, avec l'aide du logiciel QGIS afin de réaliser une carte pour identifier les habitats où se trouvent les limnées. De plus, des informations sur la végétation dans l'eau, sur les berges et la permanence de la mise en eau des habitats ont été relevées. Les mollusques collectés ont été tués dans de l'eau à 70°C, puis immédiatement stockés dans de l'éthanol à 70%. Ils ont ensuite été disséqués afin de déterminer s'ils étaient parasités puis leur ADN a été extrait en vue des analyses de biologie moléculaire.



Figure 4 : A droite, échantillonnage de limnées au bord d'une roubine par chasse à vue, à gauche, photo d'une limnée tronquée échantillonnée (*Galba truncatula*).

I. Caractérisation de l'habitat des limnées et la prévalence de *F.hepatica* chez l'hôte intermédiaire *Galba truncatula*

Notre premier objectif était d'identifier l'écologie des habitats des gîtes à mollusques, sains et parasités, afin d'essayer d'identifier des zones à risque pour la transmission de la fasciolose.

L'étude des habitats des populations de mollusques d'intérêt médical et vétérinaire est essentielle pour comprendre quels sont les sites à risque pour la transmission des maladies. Il est nécessaire d'avoir une connaissance qualitative et si possible quantitative de la composition d'une communauté dans un endroit particulier et au cours du temps. En effet, dans les communautés de mollusques, la diversité est fortement affectée par les changements de la végétation aquatique et les facteurs physico-chimiques de l'eau (Perera, 1996), ainsi que par les relations interspécifiques comme la compétition ou le parasitisme (Dillon, 2004).

De nombreuses études menées en Europe, en Afrique du Nord et en Amérique du Sud ont montré que *Galba truncatula* est une espèce préférentiellement autofécondante (Burgarella et al., 2015; Hurtrez-Boussès et al., 2010; Meunier et al., 2004, 2001; Trouve et al., 2005). Ce mollusque est capable de coloniser une grande diversité d'habitats tels que les lacs, étangs ou les rivières mais aussi des habitats entièrement construits par l'Homme (canaux d'irrigation, plans d'eau artificiels, fossés, abreuvoirs etc.). D'après Moens (1991), *G. truncatula* est capable de coloniser tous les milieux aquatiques d'eau douce qui sont instables sur le plan écologique dès lors que des algues unicellulaires, source de nourriture, sont présentes et à condition qu'il y ait peu de prédateurs, de compétiteurs et de parasites. En effet, les limnées tronquées sont capables d'envahir des milieux avec des régimes hydrographiques très variables tels que des habitats permanents (rivières, canaux d'irrigation, barrages) ou encore des habitats très temporaires qui sont seulement alimentés par la pluie ou qui peuvent être ponctuellement connectés aux réseaux hydrographiques proches. Par exemple, dans les prairies du Limousin, Vareille-Morel et al., (2007, 1999) ont montré que les habitats à limnées sont localisés à l'extrémité des rigoles de drainage, dans les fossés de route et de drainage et sur les berges des étangs et des rivières. Dans une autre étude, en Belgique, il a été montré que *G. truncatula* pouvait coloniser plusieurs milieux plus ou moins anthropisés comme des mares, des

fossés, des rigoles des prairies inondées ou des flaques créées par le piétinement des vaches (Johannes Charlier et al., 2014a).

La localisation de *G.truncatula* mais aussi des autres lymneidés a toujours été un travail difficile. Plusieurs études se sont orientées vers l'utilisation de plantes indicatrices pour détecter les gîtes à limnées dans les fermes. Des listes de plantes indicatrices ont été établies dans plusieurs pays de l'Europe de l'Ouest (Allemagne, Pays-Bas, Grande-Bretagne) (Rondelaud et al., 2011). Quelques espèces de plantes (notamment *Juncus* spp) ont été montrées comme étant de bonnes indicatrices de la présence de *G. truncatula* ((Rondelaud et al., 2011). Malheureusement, cette méthode est limitée : elle indique seulement l'existence de conditions favorables pour les limnées mais ces conditions dépendent souvent du milieu, du type du sol et de bien d'autres facteurs.
En Camargue, nous avons classé les habitats selon la typologie suivante (Figure 5) :

- Les habitats permanents sont composés des berges des roubines toujours en eau.
- Les habitats semi-permanents sont des roubines ou des mares connectées au reste du réseau pérenne mais pouvant être asséchées ou déconnectées du reste du réseau une partie de l'année.
- Le troisième habitat est temporaire : ce sont en général des mares, des flaques ou des anciens canaux déconnectés du reste du réseau qui sont remplis par les pluies durant l'année et qui s'assèchent régulièrement.

Nos prospections ont révélé la présence de *G. truncatula* dans ces trois types d'habitats.

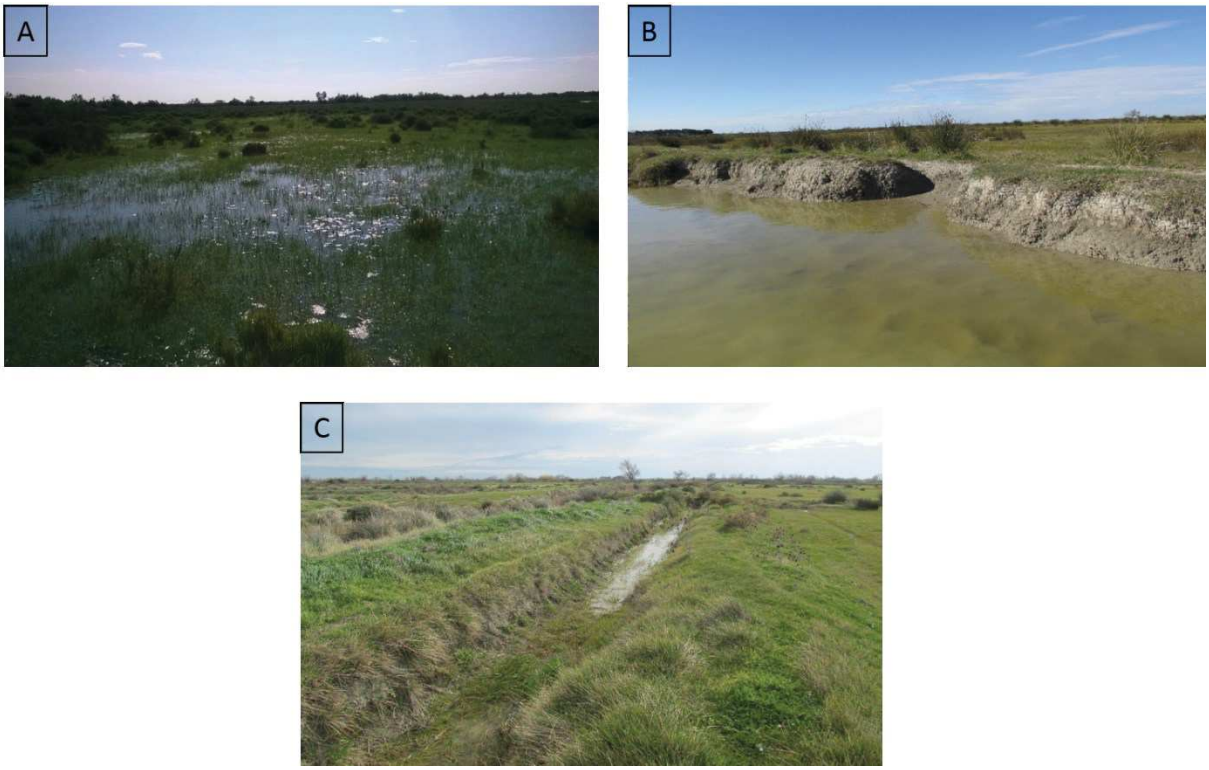


Figure 5: Les différents habitats en Camargue, 3 photos A. La photo correspond a habitat semi-permanent, ici c'est l'inondation d'une prairie dut à la fuite d'une vanne. Il y a une connexion avec le canal d'irrigation. B. C'est la photo d'un canal d'irrigation, c'est un habitat permanent. C. La photo représente un habitat temporaire, c'est un ancien canal qui n'est plus connectée mise en eau seulement par la pluie.

Afin de caractériser la végétation indicatrice de la présence de limnées, nous avons utilisé un GLM (Modèle linéaire généralisé) sur les données de présence/absence des limnées et sur les données de la végétation aquatique et de la berge (Figure 6). Les analyses sont réalisées sur la présence/absence car il est difficile d'évaluer la densité des populations de limnées sur le terrain. En effet, l'échantillonnage de limnées peut être difficile et peut dépendre des conditions météorologiques. La mise en place d'un protocole de type quantitatif n'est pas adapté à cette espèce (observation personnelle et S. Hurtrez com. Pers.). L'absence de limnées ne signifie pas forcément qu'il n'y a pas de limnée mais que nous n'en avons pas trouvé lors de nos sessions d'échantillonnages.

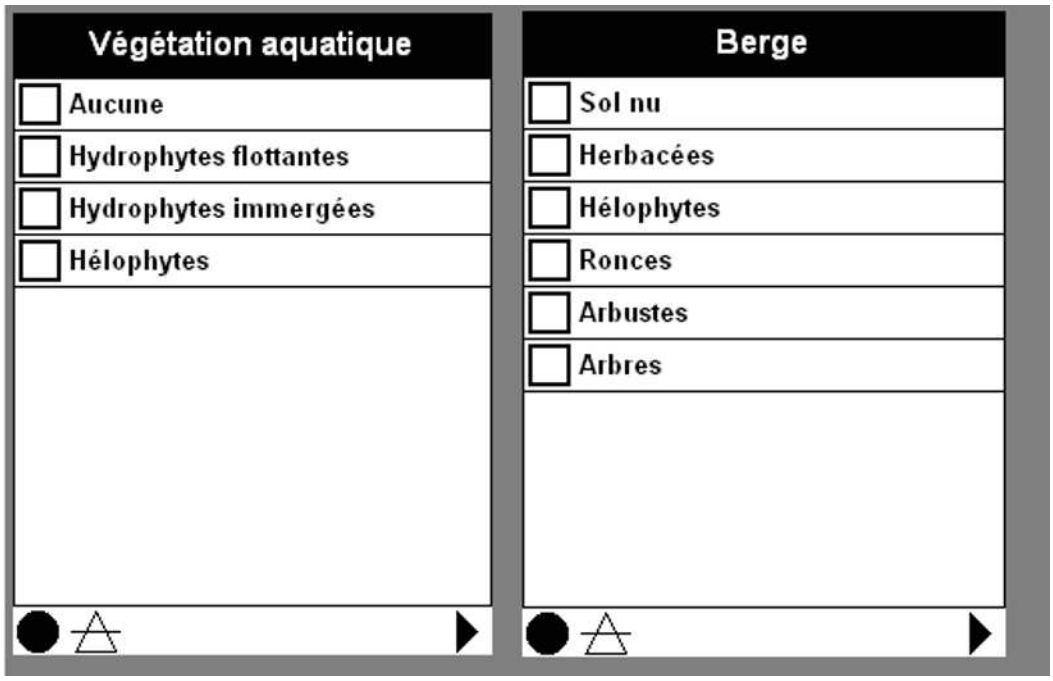


Figure 6 : Prise de note grâce à l'application cybertracker sur smartphone, nous avons mis au point un petit programme spécialement pour l'échantillonnage des limnées. Exemple pour le relevé de la végétation, fait à l'œil nu où il suffit de cocher ce que l'on voit.

Nos résultats indiquent que les limnées sont présentes sur des berges ou des mares recouvertes d'herbacées où des hydrophytes immergés sont présents. L'absence de détection est corrélée significativement avec l'absence totale de végétation aquatique et la présence de zones à joncs (*Juncus maritimus*). Ces résultats divergent de ceux de Rondelaud et al., (2009) qui montraient que les limnées sont présentes dans les zones à joncs (*Juncus acutiflorus, Juncus effusus*) et considéraient que cette plante pouvait être utilisée comme indicatrice du risque de fasciolose. En Camargue, l'espèce retrouvée est *Juncus maritimus* (Figure 7), souvent présente dans les zones humides ; elle est très tolérante à la salinité, ce qui pourrait expliquer qu'on ne retrouve pas de limnées dans ces zones. Il serait intéressant de compléter cette étude de la végétation par un suivi par mois de la conductivité et du pH de l'eau car ils peuvent être très variables selon les saisons.



Figure 7 : Photo *juncus maritimus*

Sur 2139 limnées échantillonnées au total, seules huit ont été trouvées infectées par *F.hepatica*. Ces limnées parasitées sont issues de trois sites différents. La **prévalence** globale est donc très faible (0,37%). Toutefois, si on considère la prévalence au sein des trois sites uniquement, on retrouve des prévalences de 3,8%, 3,2% et 1,3% qui se rapprochent beaucoup plus de ce qui est décrit dans la littérature (Dreyfuss et al., 2014; Mage et al., 2002; Rondelaud et al., 2001). Si on prend l'ensemble des mares temporaires et semi-temporaires, nous trouvons une prévalence de 2,1%. Comme nous ne pouvons pas évaluer la population totale, l'intervalle de confiance des prévalences ne peut être calculé. De plus, les 3 sites présentant des limnées infectées sont des mares temporaires ou semi-permanentes. Ces dernières semblent plus propices à contenir des limnées infectées car elles réunissent plus facilement les conditions requises pour la transmission. Il est vrai que les limnées y ont une exposition et un risque d'infection plus importants que dans les canaux, notamment via deux caractéristiques : l'accessibilité pour les bovins et la possibilité que les bouses stagnent dans l'eau. Il est donc possible que les mares soient des habitats où le risque de fasciolose pour les troupeaux serait plus important en Camargue que dans les canaux.

Cette prévalence faible peut s'expliquer aussi par un biais dans l'échantillonnage. En effet, certaines populations sont suivies tous les ans mais il est possible que le pic d'infection ait lieu pendant une courte période. Il serait intéressant de cibler certaines populations dans les roubines et les mares afin de les suivre tous les mois pour déterminer les pics d'infections (Chlyeh et al., 2006).

Jusqu'à présent, les études sur notre site se sont focalisées sur la limnée tronquée, *Galba truncatula*, considérée comme le principal vecteur de fasciolose en France (Abrous et al.,

1999). Devant les très faibles prévalences observées jusqu'à présent, il semble important de rechercher si d'autres mollusques peuvent être porteurs de douves en Camargue. De plus, la littérature recense des espèces vectrices autres que *G. truncatula* qui sont présentes sur le site de la Tour du Valat, en particulier des *Succineidae* (Relf et al., 2009). Ce travail a été commencé par Eric Carron, stagiaire de master 2 que j'ai coencadré durant le printemps 2017, plusieurs espèces de mollusques ont été échantillonnées et disséquées, parmi celle-ci des lymnaidae avec *G.truncatula*, des physidae (60), des succinidae (1) et des Cochlicellidae (19). Pour l'instant, seule *Galba truncatula* a été retrouvée infestée. Ce travail doit être poursuivi en prospectant sur le domaine en intensifiant la recherche dans les habitats temporaires.

Les études sur l'écologie des limnées en conditions naturelles ne sont pas très nombreuses par rapport à celles sur les planorbidés vecteurs de schistosomiase (Pointier et al., 2005; Pointier and Jourdane, 2000). Pourtant, il est essentiel, lorsque des espèces sont impliquées dans la circulation d'une maladie humaine ou vétérinaire, de pouvoir prédire leurs aires de répartition, c'est en effet un avantage considérable dans la priorisation des zones à risque. Les études génétiques sont aussi une des approches essentielles pour aider à mieux comprendre les interactions hôtes-parasites (de Meeûs et al., 2007). Par ailleurs, 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. C'est pourquoi dans cette deuxième partie, nous nous intéressons à l'influence de la permanence de l'habitat sur la structure génétique des populations de limnées.

II. Permanence de la mise en eau des habitats : Quels impacts sur la structuration génétique de *Galba truncatula ?*

Notre objectif est d'ici étudier la relation entre les types d'habitats (temporaires, permanents et semi-permanents) et la structure des populations de *G. truncatula*. En effet, il est couramment admis que les populations hôtes ayant une faible diversité génétique sont plus sujettes à de fortes prévalences d'infection que les populations ayant une plus grande diversité génétique (Ganz and Ebert, 2011; Garrett and Mundt, 1999). Chez les hôtes intermédiaire de *F.hepatica*, plusieurs études ont montré que des populations présentant une plus faible variabilité génétique pouvait être plus sensibles à l'infection par *F. hepatica* (Lounnas et al., 2017). Si les habitats influent sur la structure des populations

de *G.truncatula*, certaines populations, selon l'habitat, pourraient être plus sensibles à l'infection par *F.hepatica*.

On sait que la permanence des habitats peut avoir un effet sur la dynamique des populations des mollusques (Chapuis and Ferdy, 2012). En effet, dans les habitats temporaires, les mollusques peuvent être plus sensibles à la sécheresse en été et au gel en hiver. Une étude de Goumghar et al. (2001) a montré que la sécheresse peut réduire de 30 à 80 % le taux de survie des limnées dans les populations du centre de la France. Les basses températures en hiver peuvent aussi modifier la fitness des mollusques en augmentant la croissance et la mortalité (Roberts, 1950; Rondelaud et al., 2009a). Les populations des habitats temporaires sont donc soumises régulièrement à des **goulots d'étranglement** et à des dynamiques d'extinctions-recolonisations importantes entraînant une dérive génétique extrêmement forte pouvant aboutir à la fixation d'un **génotype** par population et donc à la diminution de la diversité génétique (Jarne, 1995; Meunier et al., 2004, 2001; Mintsa Nguema et al., 2013; Nicot et al., 2008). Ce patron a d'ailleurs été démontré au moins chez deux autres lymneidés : *P.columella* et *Galba schirazensis* (Lounnas et al, 2015 thèse).

En Camargue, notre étude montre les mêmes patterns que ceux précédemment décrits par des travaux chez cette même espèce, c'est-à-dire de très forts écarts à la **panmixie**. Toutefois, les populations de limnées en Camargue présentent des valeurs de Fis très variables, entre 0,4 et 0,9, et donc des taux d'autofécondation estimés entre 60 et 90%. Ces résultats diffèrent légèrement de ceux trouvés dans les études antérieures sur *G. truncatula* (Hurtrez-Boussès et al., 2010; Meunier et al., 2004, 2001; Trouve et al.,2005) menées sur des populations de Suisse, Bolivie, Espagne, Maroc, Portugal et France (régions Centre et Languedoc-Roussillon) : tous les taux d'autofécondation estimés étaient supérieurs à 80%. La diversité génétique est aussi plus importante que dans les études précédentes avec 732 Génotypes sur 766 limnées analysées ayant un génotype complet et un He variant entre 0.147 et 0.582. Cette diversité génétique relativement forte en Camargue confirme que la présence de *G.truncatula* ne résulte pas d'une invasion récente, contrairement au cas de l'Altiplano bolivien où une étude de Meunier (2001) a montré son arrivée récente. Cela suggère aussi que les populations pourraient être moins soumises à la dérive génétique que dans d'autres sites en France ou en Europe. Mais cette diversité génétique peut être très variable selon les habitats.

En effet, les paramètres de génétique des populations diffèrent en fonction des types d'habitats (Figure 8). Les populations de limnées dans les habitats temporaires présentent une diversité génétique et une richesse allélique plus faibles en comparaison avec les habitats semi-permanents et permanents. Cette faible diversité génétique peut s'expliquer par des réductions drastiques des effectifs de populations avec de nombreux goulots d'étranglements entrainant une dérive génétique plus forte. Les populations se retrouvent complètement déconnectées et les probabilités de recolonisation sont très faibles. Les populations de ces habitats ont aussi un Fis plus élevé, qui pourrait s'expliquer par les caractéristiques de l'habitat. En effet, les individus autofécondants, capables de refonder seuls une population, sont censés être fortement avantagés. Le maintien de l'autofécondation à de forts taux peut donc être adaptatif chez des organismes caractéristiques d'habitats temporaires. Les taux d'autofécondation plus faibles dans certaines populations des habitats permanents et semi-permanents pourraient alors être liés à une plus grande stabilité de ces habitats. De plus, la diversité génétique et la **richesse allélique** sont significativement plus importantes dans les habitats semi-permanents par rapport aux habitats temporaires. Ces populations étant connectées les unes aux autres une partie de l'année, elles seraient moins sensibles à la dérive génétique car l'apport de nouveaux entrants se ferait plus facilement grâce à leur connexion aux habitats permanents. Ces populations ont aussi une diversité génétique plus importante que les populations d'habitats permanents, les milieux permanents étant stables, la compétition ou la prédation peuvent être plus accrues que dans les milieux temporaires augmentant la dérive génétique dans ces habitats.

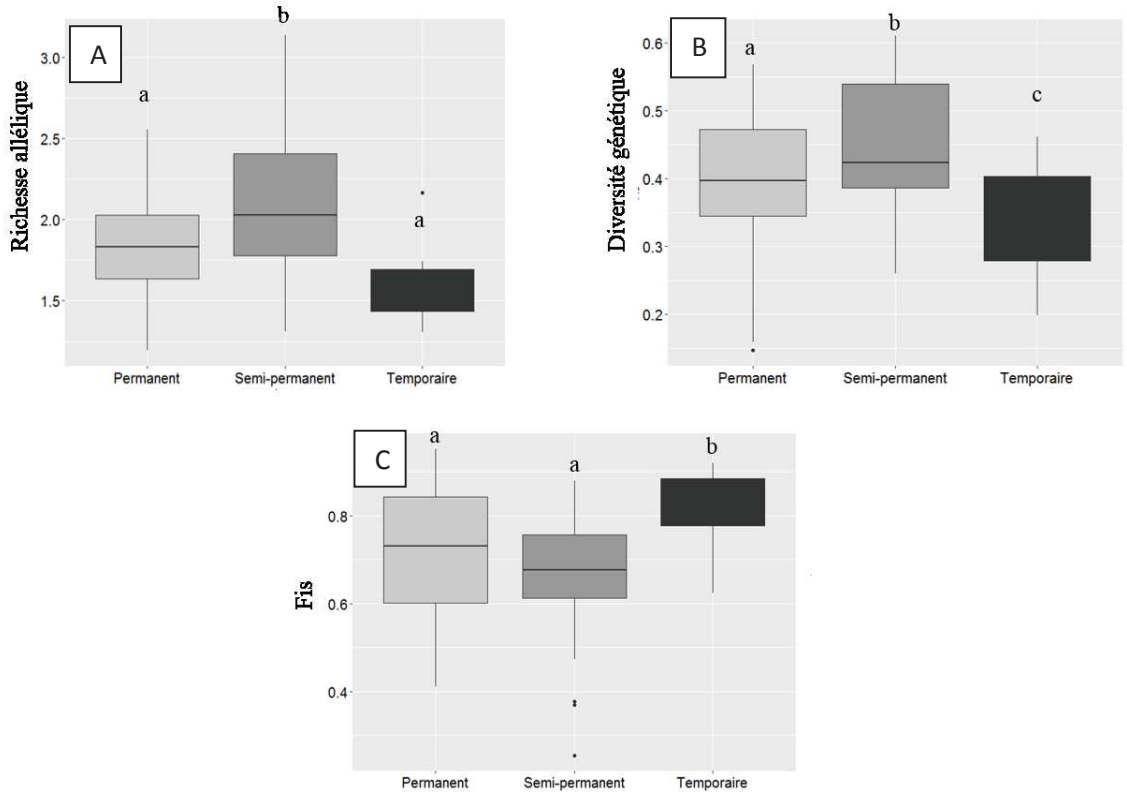


Figure 8: Boxplot du Fis(C), de la diversité génétique(B) et de la richesse allélique(A) selon le type d'habitat (permanent, semi-permanent, temporaire). La ligne du milieu représente la médiane, la ligne du haut est le 3e quartile et la ligne du bas le 1er quartile.

Des études en laboratoire (croisements expérimentaux et tests de descendance entre individus issus des différents habitats, comme dans Meunier *et al* (2004b) devront être menées pour savoir si les taux d'autofécondation observés ici ont une base génétique (auquel cas l'hypothèse d'une adaptation à des milieux stables pourrait être recevable) ou s'il s'agit de plasticité phénotypique. Il serait également intéressant de tester expérimentalement si les populations présentes dans les différents habitats sont plus ou moins sensibles à *F. hepatica*. En effet, à Cuba, il a été montré que les populations de *P. columella* résistantes à l'infection semblaient supporter des habitats non favorables aux autres mollusques (Vàsquez et al, 2014).

Plusieurs expérimentations sur les limnées ont mis en évidence des résultats intéressants comme l'étude de Meunier *et al*. (2004b) qui a montré que la proportion d'**allofécondation** peut être augmentée (jusqu'à 39 %) lorsque les limnées sont placées à des densités très élevées. Une autre étude, sur *G. truncatula de* Chapuis and Ferdy, (2012), a démontré que les individus des habitats permanents arrivent à maturité à un âge plus

jeune, à une taille plus petite, et pondent plus d'œufs en 30 jours que les individus des habitats temporaires. Ce résultat est "surprenant" car selon la théorie de McArthur et Wilson (1967), on s'attendrait à observer le schéma inverse : les individus vivant dans un habitat temporaire ont une maturité sexuelle plus précoce, une taille plus petite et sont plus féconds que les individus d'un habitat permanent. Cependant, il a été montré qu'une grande taille aide à survivre aux périodes de sécheresse et est donc certainement sélectionnée dans des habitats temporaires.

L'expérimentation est donc essentielle pour comprendre les mécanismes de l'évolution mais aussi les interactions avec le parasite.

III. Connexion des habitats : Impacts sur la dispersion des limnées.

Historiquement, l'évolution des traits favorisant la dispersion a d'abord été comprise comme une adaptation caractéristique des habitats instables, permettant la recolonisation des espaces ouverts par les perturbations dans une **métapopulation** (Van Valen, 1973). Puis il a aussi été montré en épidémiologie que la dispersion pouvait jouer un rôle dans les processus de **co-adaptation** hôte-parasite (Mazé-Guilmo et al., 2016). L'étude de la dispersion de l'hôte et du parasite est donc essentielle pour comprendre les interactions entre les deux.

Comme on l'a dit précédemment, les mollusques d'eau douce ont une grande capacité d'invasion. En effet, ils sont capables de se disperser de façon active ou passive. La dispersion active par déplacement sur le fond appelé aussi déplacement rhéotropique a été observée chez plusieurs espèces de la famille des lymnaidae comme chez *lymnaea tomentosa* (Boray et al., 1969) et chez *G.truncatula*. En effet, des études de Rondelaud et al (1983) et Moens en 1982 ont montré que *G.truncatula* migraient de l'aval d'un réseau hydrographique vers l'amont en utilisant ce déplacement, lors de ces migrations, la vitesse du courant n'interviendrait que faiblement sur l'amplitude des distances parcourues par les limnées. Pour la dispersion passive, plusieurs études ont montré que des mammifères comme les sangliers, les éléphants, les buffles, les ragondins mais aussi les oiseaux aquatiques (Viana et al., 2013) peuvent transporter des œufs ou des invertébrés lors de leurs déplacement entre deux points d'eau, favorisant ainsi la propagation des escargots d'eau douce ; ceci entraîne la colonisation entre des zones pouvant être très éloignées

(Vanschoenwinkel et al., 2011, 2008; Waterkeyn et al., 2010). Les courants (Hurtrez-Boussès et al., 2010) les inondations peuvent aussi participer à la dispersion passive ce qui augmenterait le flux génétique entre les populations de mollusques (Kawata et al., 2005).

L'extension des zones irriguées, la gestion des zones humides avec la gestion des entrées d'eaux douces sont autant de pratiques susceptibles de favoriser la dispersion des organismes aquatiques. En effet, les cycles naturels d'asséchement et de remise en eau de nombreux cours d'eau ont été modifiés par les changements induits par l'Homme (Bohonak and Jenkins, 2003). Par exemple, de nombreux cours d'eau qui étaient autrefois temporaires sont maintenant pérennes, en raison des modifications dues à l'agriculture et à l'urbanisme. Les réservoirs créés pour le stockage de l'eau ont modifié les cycles hydrologiques naturels et les schémas de connectivité des cours d'eau. De nouveaux réseaux hydrographiques ont été construits comme les réseaux d'irrigations et les barrages. Ces changements ont créé de nouveaux habitats pour les mollusques pouvant modifier la structure génétique des populations présentes, soit en augmentant ou en diminuant le flux génétique entre les populations (Zickovich and Bohonak, 2007).

En effet, les habitats peuvent être colonisés par un ou plusieurs individus avec des génotypes semblables (**effet fondateur**). Les descendants peuvent envahir toutes les parties de l'habitat. Dans ce cas, la variabilité génétique de la population sera extrêmement faible. Par contre, si l'habitat est colonisé par plusieurs individus avec des génotypes hétérogènes, la quantité de diversité génétique dépendra des **flux de gènes** entre les différentes parties de l'habitat. Cette diversité génétique sera aussi liée à la connectivité et l'architecture de l'habitat, par exemple, s'il y a présence de barrière ou non. En étudiant la diversité génétique des populations de limnée tronquée dans un réseau hydrographique, une étude dans le département de l'Hérault a mis en évidence un isolement par la distance le long 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 (Hurtrez-Boussès et al., 2010). Une autre étude sur la génétique des populations de *Physa acuta* dans le Parc national de Donana en Espagne (Van Leeuwen et al., 2013) et dans des rizières proches, appuie l'idée que les escargots aquatiques se disperseraient facilement par des connexions directes dans les rizières inondées mais peuvent être aussi transportés par les oiseaux d'eau entre des habitats non connectés. En

effet, les populations du parc et des rizières sont génétiquement similaires. Les auteurs proposent également que dans le parc, les mollusques sont dispersés entre les mares par les mammifères. Ces études confirment la capacité des escargots aquatiques à exploiter plusieurs vecteurs de dispersion.

Ainsi, pour mieux comprendre la dispersion des populations de limnées le long des systèmes d'irrigation de Camargue et dans les mares, nous nous sommes intéressés à la génétique des populations des limnées. Pour cela, nous avons calculé les distances euclidiennes qui correspondent aux distances entre deux points d'échantillonnages à vol d'oiseau et les distances hydrographiques qui sont les distances entre deux points en suivant le réseau hydrographique. Nos résultats indiquent qu'il existe un isolement par la distance hydrographique pour les populations du réseau permanent mais que si l'on prend les distances euclidiennes entre ces populations, on ne retrouve pas cet isolement, ce qui est cohérent avec les résultats de Hurtrez-Boussès et al. (2010). On peut donc supposer que les populations connectées entre elles par les réseaux hydrographiques permanents se dispersent plus facilement de proche en proche le long des canaux grâce au déplacement rhéotropique et passivement en suivant le flux hydrique. En revanche, pour le réseau temporaire (habitats qui sont connectés au réseau permanent occasionnellement), on trouve un isolement par la distance euclidienne et hydrographique. Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces populations sont plus éloignées entre elles : il y a une forte corrélation entre les distances hydrographiques et les distances euclidiennes. Il est possible que la dispersion des limnées dans ces populations se fasse de proche en proche pour les populations voisines mais qu'il existe aussi une dispersion passive par les mammifères ou lors d'inondations des prairies pendant l'automne et le printemps. Pour les populations des habitats non connectés aux réseaux hydrographiques temporaires et permanents, nous n'avons pas détecté d'isolement par la distance. Parmi les sites échantillonnés, les populations d'habitats temporaires sont beaucoup moins nombreuses que les autres, il est donc possible que nous ne détections pas d'isolement à cause d'un manque de puissance statistique.

La compréhension de la dynamique de l'hôte intermédiaire est cruciale pour ensuite comprendre la dynamique du parasite et l'ensemble de ce cycle. De plus, l'étude de l'hôte intermédiaire nous permet d'identifier les gîtes à mollusque et donc les zones à risque de transmission de fasciolose pour les bovins.

Message à retenir

Les limnées en Camargue semblent coloniser des habitats caractérisés par la présence d'herbacée et de plantes aquatiques, par contre elles semblent éviter les milieux avec la présence d'hélophyte.

Les mares semblent être des zones avec un risque plus important de fasciolose

L'habitat influe sur la génétique des populations des limnées, les populations dans les habitats temporaires subissant une plus grande dérive génétique, alors que dans les habitats semi permanent, leur connectivité permet d'éviter cette dérive avec un apport régulier de propagule.

La dispersion des limnées sur le domaine de la Tour du Valat, se fait principalement de proche en proche le long des canaux dans les réseaux permanents. Cependant, pour les limnées dans les habitats semi permanents, il se fait grâce au transport par les animaux et aussi de proche en proche le long du réseau temporaire.

Pour conclure, les résultats de ce chapitre soulignent l'importance du rôle de l'habitat sur les communautés de mollusques en Camargue. Cependant, la présence de l'hôte intermédiaire n'est pas suffisante pour éviter le risque de transmission aux troupeaux de bovins. En effet, l'exposition et la sensibilité des hôtes définitifs et les échanges entres eux mais aussi avec la faune sauvage doivent être pris en compte dans l'évaluation et le contrôle du risque de fasciolose. C'est pourquoi, dans le chapitre 2, nous étudierons la dynamique du parasite chez les hôtes domestiques.

Chapitre 2 : Dynamique de population de *Fasciola hepatica* dans la faune sauvage et domestique en Camargue

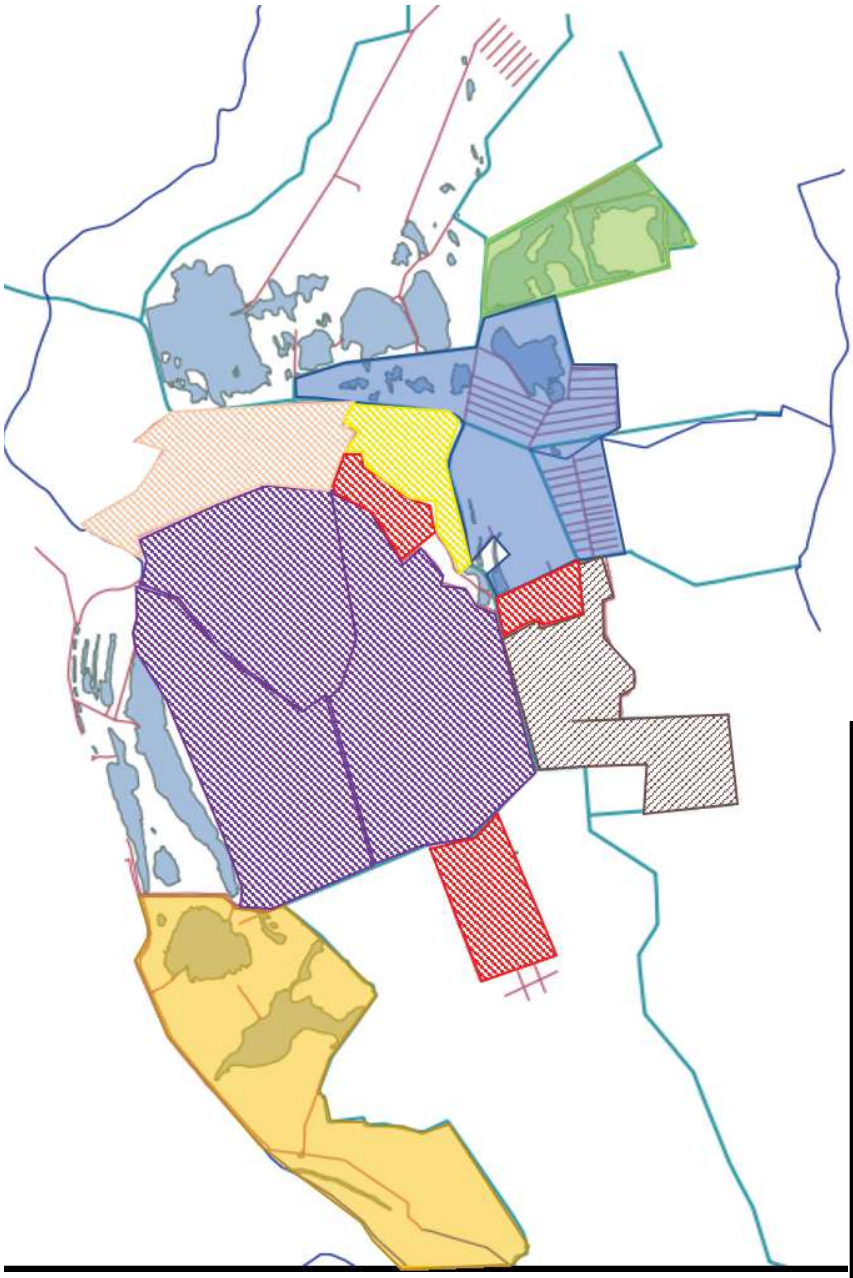
Ce chapitre nous permettra d'avoir une meilleure compréhension de la circulation de la fasciolose au sein du compartiment hôtes définitifs. Il se découpe en cinq parties : nous nous intéresserons premièrement aux risques associés à la fasciolose puis à l'impact de la grande douve du foie sur la santé des bovins puis à la dynamique du parasite au sein du troupeau non traité. Ensuite, une partie portera sur la dynamique au sein du troupeau traité en comparaison avec le troupeau non traités. Et pour finir, la dernière partie traitera de la circulation du parasite au sein et entre les différents hôtes définitifs domestiques et sauvages (**Article 2**).

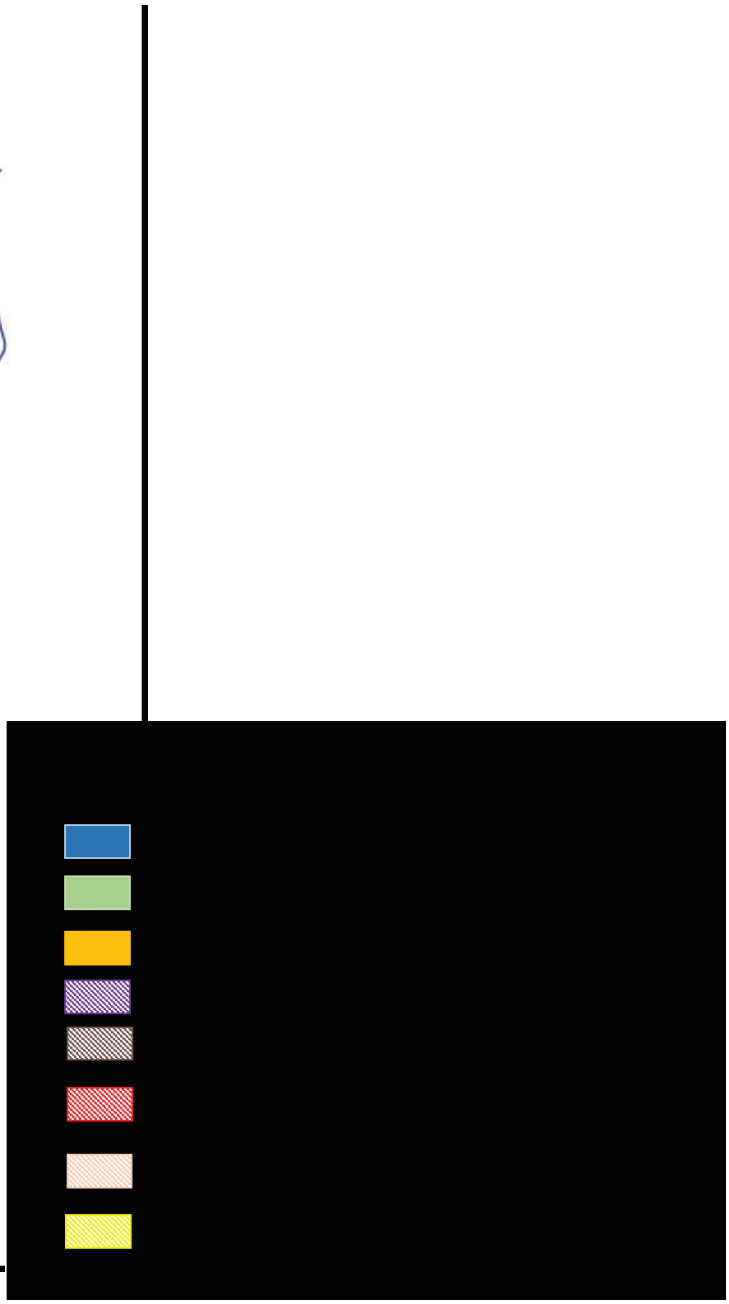
Pour cela, les douves adultes ont été échantillonnées aux abattoirs de Tarascon et Pézenas, lors de chaque session d'abattage des taureaux mais aussi dans chaque mammifère sauvage (sanglier, ragondin) abattu sur le domaine. Les échantillonnages ont été réalisés de septembre 2014 à janvier 2018. Les foies ont été soigneusement examinés (après incisions latérales des lobes) pour rechercher la présence de grandes (F. hepatica) et petites douves (*Dicrocoelium dendriticum)* (Figure 9). L'hôte domestique est le taureau (*Bos taurus*) ; tous les individus présents sur le site appartiennent à la race *Raço di Biou* (Taureau de Camargue), originaire des Bouches-du-Rhône, et sont élevés de manière extensive (i.e. en extérieur toute l'année) (Encadré 3). Les taureaux étudiés proviennent de quatre manades, qui pâturent toutes sur le domaine de la Tour du Valat : la manade de la Tour du Valat, dont les animaux ne sont jamais traités aux antihelminthiques et les manades Blanc, Bon et Mailhan qui traitent les taureaux une fois par an au Dovenix (r) en novembre/décembre (Carte 4). Le Dovenix (r), à base de Nitroxinil, est exclusivement un douvicide : il agit sur les stades adultes de la grande douve. Il est administré par une solution injectable par voie sous cutanée au plus tard 66 jours avant l'abattage.





Figure 9 : A droite, photo du découpage des sangliers pour la récupération des foies après une battue. A gauche, photo de *F.hepatica* dans un foie





Carte 4 : Carte de la répartition des troupeaux sur le domaine de la Tour du Valat.

Encadré 3 : L'élevage des taureaux camarguais

Il existe plusieurs hypothèses sur l'origine des taureaux de Camargue, *Raço di Biou*. Pour certains, ils seraient d'origine asiatique. Pour d'autres, ils seraient liés aux aurochs africains qui auraient également vécu en Espagne. Pour d'autres encore, ils seraient les descendants d'une race bovine chassée pendant la préhistoire, il y a 20 000 ans (Mailhan and Colombaud, 2013).

Au départ, ces bovins étaient utilisés essentiellement comme animaux de travail jusqu'au milieu du 19e siècle. Puis les jeux taurins vont se développer et le nombre de manades va augmenter. Le cheptel bovin passe de 3000 têtes en 1890 à quelque 20 000 têtes en 2011(Mailhan and Colombaud, 2013).

Le taureau a un rôle primordial dans la vie culturelle et sociale de la région. La finalité première d'une manade reste la participation à la course camarguaise, jeu traditionnel local reconnu comme un sport officiel depuis 1975. Néanmoins, le revenu provenant de la boucherie n'est pas négligeable. Les conditions d'élevages sur des pâturages naturels et des zones humides protégées, lui ont permis de bénéficier en 1996, d'une appellation d'origine contrôlées (AOC, taureau de Camargue) puis, en 2001, d'une appellation d'origine protégés (AOP, reconnaissance européenne). Enfin les revenus liés au tourisme se développent de nos jours avec les « Safaris » en Camargue.

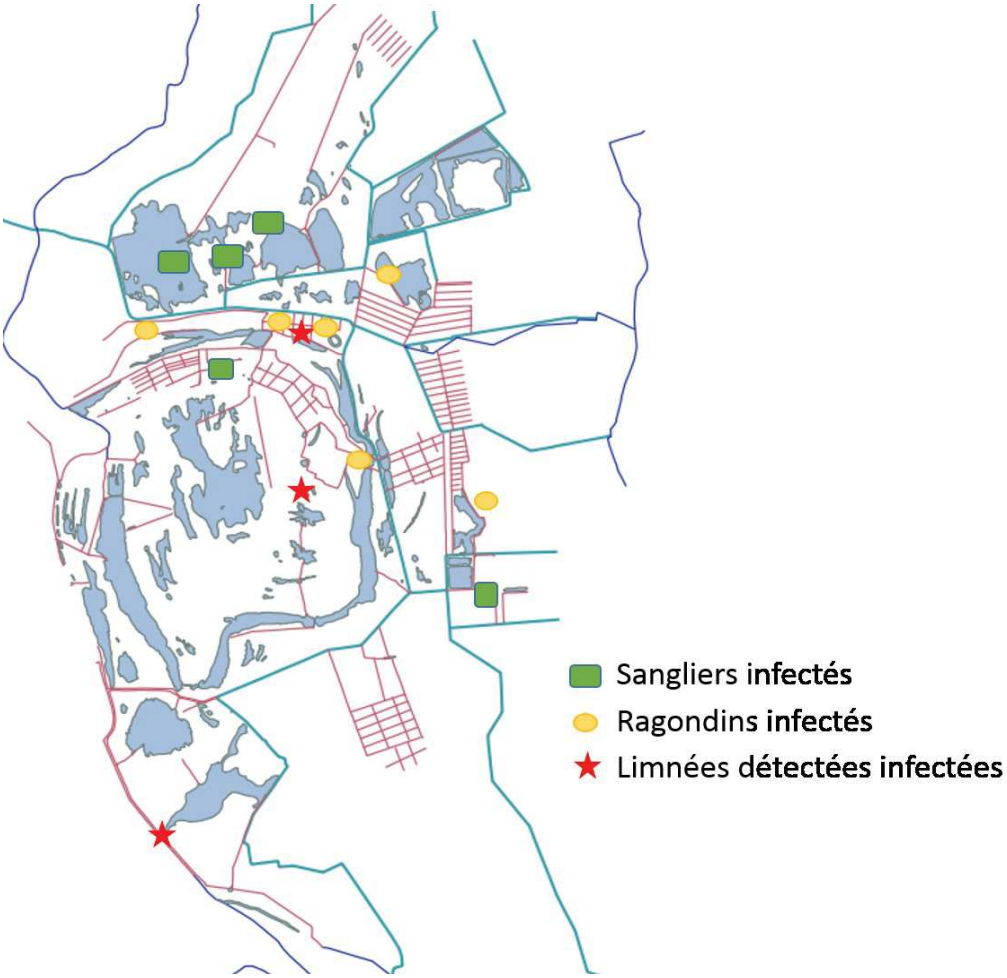
Une des spécificités de ces bovins est que leur mode de vie a été conditionné par les facteurs environnementaux. En effet, ces taureaux sont élevés de manière extensive, ils pâturent en extérieur toute l'année, avec une majorité de pâturage en parcours (enganes, sansouïres, marais…) et prairies (PNR Camargue, 2011). Cette vie libre associée à la sélection des animaux les plus combatifs depuis de nombreuses génération rendent nécessaire l'utilisation de chevaux pour tout déplacement des animaux. Ainsi, l'élevage extensif conserve au taureau de race Camargue son caractère rustique, résistant, sauvage et agressif, tout en garantissant le maintien des équilibres économiques, environnemental, biologique, social et culturel.

Les premiers taureaux de la manade de la Tour du Valat ont été achetés en 1994. La sélection s'est faite en priorité sur la provenance des animaux puis sur leur docilité contrairement aux autres manades qui privilégient les animaux agressifs pour les courses. Actuellement, il y a trois lots de femelles avec une trentaine de vaches par lot, un lot de génisses de moins de 2 ans avec environ 100 vaches et un lot de mâles, d'une centaine de taureaux (Pinau. O.com.pers). La manade de la Tour du Valat a obtenu la certification Agriculture biologique en 1997. Les animaux ne sont plus traités aux antihelminthiques depuis 2005. La prophylaxie annuelle obligatoire (Tuberculose, brucellose, leucose et IBR) se déroule en octobre-novembre. De plus, les veaux restent avec leur mère jusqu'à l'âge de 6 mois.



Pour chaque individu hôte, les paramètres suivants sont notés : le statut, adulte ou juvénile, et le sexe. Lorsque ceux-ci sont fournis par l'éleveur, le piégeur ou la société de chasse sont en plus relevés : la zone de piégeage ou les sites de pâtures, la masse corporelle au moment de l'abattage, l'âge précis, la généalogie.

I. Les risques associés à la transmission de la fasciolose



Carte 3: Carte des sangliers, des ragondins et des sites à limnées présentant une **infestation** de la fasciolose qui ont été prélevés et échantillonnés entre 2013 et 2017.

Le risque d'infection de la fasciolose est souvent très hétérogène à l'échelle d'un territoire mais aussi à l'échelle d'une ferme. Le risque de transmission peut notamment varier en

fonction de l'environnement, avec des écosystèmes favorables ou non à la présence de gîtes à mollusque. Ces gîtes n'est pas toujours accessible aux troupeaux. La gestion du troupeau avec le type d'élevage, la rentrée des animaux en hiver, le traitement ou encore la race utilisés peuvent avoir une influence sur le risque (Bennema et al., 2011; Charlier et al., 2011; Khan et al., 2013; Sánchez-Andrade et al., 2002). Par ailleurs, certaines saisons présentent plus de risques avec des pics d'infection variables durant l'année (Khan et al., 2013; Novobilský et al., 2014; Phiri et al., 2005; Suon et al., 2006). De plus, la présence d'animaux sauvages sur le territoire peut aussi jouer un rôle dans l'augmentation du risque pour les bovins (Ménard et al., 2001; Walker et al., 2011). Ce risque hétérogène (Carte 3) a été observé sur la Tour du Valat, qui est composée d'un très vaste domaine (2600 hectares). De nombreux gîtes à limnées ont été trouvés mais très peu présentaient de limnées infestées, et ces sites étaient dispersés sur le domaine alors que 92% des taureaux sont infestés et pâturent sur l'ensemble du domaine. L'hétérogénéité spatiale du risque doit donc être prise en compte. A l'échelle d'un troupeau, le sexe et l'âge des individus peuvent aussi être des facteurs important de modulation des risques de transmission (Khan et al., 2013; Phiri et al., 2005).

Nous avons donc observé la probabilité d'infection des taureaux en fonction de leur catégorie d'âge et de leur sexe au sein du troupeau de la Tour du Valat. Afin de savoir si une catégorie d'individus a une probabilité d'infection plus grande, un modèle linéaire généralisé (GLM) a été utilisé pour évaluer les relations entre l'intensité parasitaire, l'âge et le sexe. Nos résultats indiquent que plus les individus sont vieux plus ils ont une intensité parasitaire élevée. Il a été montré que, contrairement à ce qui est observé chez le mouton, la protection acquise contre une réinfestation pouvait être importante chez le bovin (Behm & Sangster, 1999). Ainsi, une réduction de l'intensité parasitaire de 56 à 94 % a déjà été observée après une réinfestation (Doy & Hughes, 1984b). Cependant, cette protection acquise pourrait être moins efficace chez les individus les plus âgés, en effet avec l'âge, l'immunité peut perdre en efficacité. Par ailleurs, le pâturage des animaux toute l'année en extérieur et le non traitement, pourrait favoriser l'accumulation de douves. Une autre tendance non significative montre que les individus de trois ans et moins présentent également plus de douves. Cependant le jeu de données ne comporte que très peu d'individus de cette catégorie d'âge. Cette tendance est en accord avec celles observées lors de l'étude de Kuchai, 2011), en effet, ce résultat peut être associé à un

système immunitaire dit « naïf » (i.e. qui n'a pas encore rencontré le parasite) pour les individus en bas âges .

L'effet du sexe et l'interaction entre l'âge et le sexe ont aussi été testés. Parmi, les vieux individus, les femelles semblent les plus parasitées. Cependant il est difficile d'évaluer la robustesse de cette tendance car le jeu de données contient beaucoup de femelles âgées et peu de mâles âgés (castrés et non castrés). Les mâles non castrés sont également moins nombreux par rapport aux deux autres catégories. Nos résultats indiquent aussi que les mâles non castrés ont une charge parasitaire plus faible que les femelles et que les mâles castrés. Leur prévalence est aussi plus faible avec 73% alors que la prévalence pour les femelles est de 96% et de 88% pour les mâles non castrés. D'autres études ont montré une prévalence plus forte chez les femelles (Baldock and Arthur, 1985; Cawdery,1984; Maqbool et al., 2002). Lors de la gestation et de la lactation, les femelles sont plus sensibles au stress (Spithill et al.,1999). Par ailleurs, il a été montré que le stress pouvait induire une augmentation des infections (Tao et al., 2012). Pour les mâles castrés, comme ils ne se reproduisent pas, ils n'allouent pas d'énergie pour la reproduction et il est donc possible que leur système immunitaire soit plus efficace. De plus, la testostérone peut être un inhibiteur du système immunitaire (Beckage et al., 1997). Les mâles castrés ne pâturent pas avec les femelles contrairement aux mâles non castrés qui passent 1 mois par an dans le pâturage des femelles. Les pâtures des femelles présentent peut être plus de risques de fasciolose. En accord avec cette hypothèse, des études ont noté une différence de prévalence entre les mâles et les femelles due à une gestion distincte du pâturage des deux sexes.

II. Effets de la grande douve du foie sur la condition corporelle du bétail

Nous avons ensuite testé s'il existe une relation entre la charge parasitaire et l'impact de la fasciolose sur la condition corporelle du troupeau. Pour ce faire nous avons évalué les liens entre la charge parasitaire, l'âge, le sexe et le poids en tant que proxy de la condition corporelle. Nous avons aussi recueilli les observations de l'éleveur.

En Europe, la fasciolose est une maladie principalement étudiée du fait des impacts économiques qu'elle peut avoir sur les élevages, les cas humains étant très rares. Chez les animaux d'élevage, les douves (*Fasciola* spp.*)* peuvent induire l'affaiblissement des

hôtes, engendrant des pertes de productions importantes comme la réduction de la production et de la qualité de la laine chez les moutons ou encore la baisse de la production de viande avec l'arrêt prématuré de la croissance ou la baisse de la qualité et la quantité du lait chez les bovins (Torgerson and Claxton, 1999). De plus, les individus infectés perdent du poids, ce qui augmente les risques de mortalité dans les élevages. Le coût de production s'en trouve accru à cause de l'augmentation de l'apport en nourriture, du temps d'entretien, des soins mais aussi du remplacement des animaux infectés.

Certaines espèces et classes d'âges sont plus sensibles que d'autres à l'infection. Par exemple chez les bovins, les jeunes sont souvent plus sensibles à la maladie (Chauvin et al., 2007) que les adultes. En outre, les moutons sont en général plus sensibles à l'infection que les bovins et présentent des symptômes beaucoup plus graves (Chauvin et al., 2007). La sensibilité à l'infection peut aussi varier selon la race. En effet, certaines races ovines sont décrites comme résistantes à la fasciolose ; c'est par exemple le cas des moutons *Indonesian thin tail*, race résistante à *F. gigantica* mais sensible à *F. hepatica* (Pleasance et al., 2011; Roberts et al., 1997). D'après la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), deux races de buffles (*Kerbau-Kalang, Kerbau Indonesia*) du sud-est de l'Asie seraient résistantes ou tolérantes à la fasciolose (FAO, 2007). D'autres races dites rustiques ou indigènes peuvent être résistantes à d'autres maladies. Par exemple, les moutons Red Massai, originaires d'Afrique, sont résistants aux nématodes gastro-intestinaux (Baker and Gray, 2004). Cette résistance et cette tolérance peuvent s'expliquer par des centaines d'années de **co-évolution** entre les parasites et les hôtes.

Au cours de la dernière décennie, des progrès satisfaisants ont été réalisés dans l'évaluation des impacts économiques de l'infection de *F. hepatica* chez les ruminants, et ceux-ci ont été examinés en détail chez les moutons (Rojo-Vázquez et al., 2012) et chez les bovins (J. Charlier et al., 2014). Toutefois, il peut être difficile d'estimer l'impact de *Fasciola* spp sur certains paramètres comme la fertilité. Le principal défi consiste à développer des outils capables de quantifier l'impact économique de *F. hepatica* aux niveaux national, régional et local afin de faciliter la prise de décisions par les gouvernements, les organisations de santé animale et les éleveurs. En effet, les méthodes actuellement utilisées se basent principalement sur des estimations de production moyenne, elles ne prennent pas en compte la performance globale de l'exploitation. L'éleveur devrait pouvoir calculer le rapport coûts-bénéfices de sa gestion de la grande

douve du foie dans une vision plus globale des coûts et des gains de l'exploitation incluant l'ensemble de la gestion de la santé du troupeau mais aussi les autres paramètres tels que les coûts en nourriture ou ceux liés à l'entretien de l'exploitation. Récemment, une méthode a été développée avec succès pour estimer l'impact des nématodes gastro-intestinaux chez les bovins (van der Voort et al., 2014; Van Der Voort et al., 2015), et devrait maintenant être étendue à d'autres pathogènes, dont *F. hepatica*. Cette méthode prend en compte la conversion des intrants (alimentation, entretien de la ferme, soins des animaux) en extrants (productions) et compare le niveau de rendement d'une ferme avec le niveau de rendement de fermes homologues utilisant des technologies de production similaires (Coelli et al., 2005). Un avantage majeur de cette méthode est la possibilité de lier une maladie animale ou son diagnostic au coût des intrants, qui est au cœur du processus décisionnel de l'agriculteur. Il est donc indispensable dans un premier temps d'établir la prévalence de la maladie chez les bovins et de comprendre sa circulation dans le troupeau.

Nous avons ainsi voulu savoir si la fasciolose avait un effet sur la santé des bovins. Dans un premier temps nous avons recueilli le ressenti de l'éleveur. Selon le directeur du domaine de la Tour du Valat, depuis l'arrêt des traitements en 2005, il n'y a pas eu de baisse de la fertilité avec un succès reproducteur moyen de 0.75 (+/- 0.12 SD) (Figure 10). Aucune hausse notable de la mortalité n'a non plus été observée.

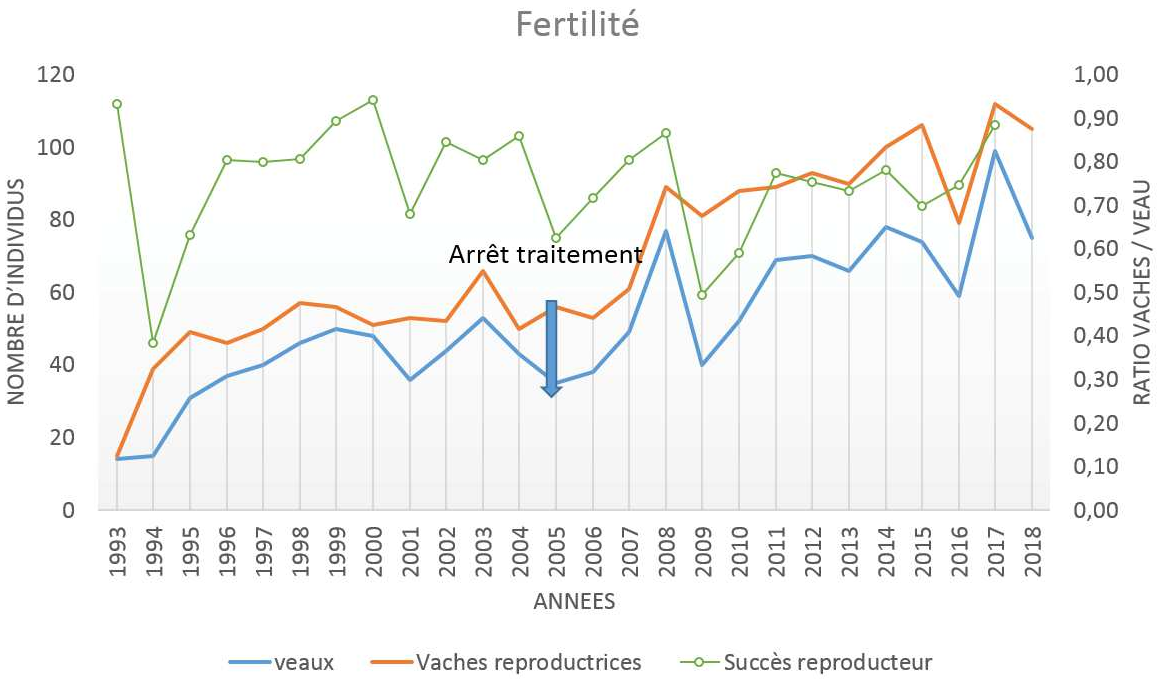


Figure 10: Graphe représentant le nombre de vaches reproductrices, le nombre de veaux et le succès reproducteur par année de 1993 à 2018.

La prévalence de la grande douve du foie chez les taureaux de la Tour du Valat est de 96 % (N=169) avec une abondance moyenne de 15 (14 +/- SD) (Figure 11), on observe aussi 70 % de coinfections avec *D.dendriticum*.

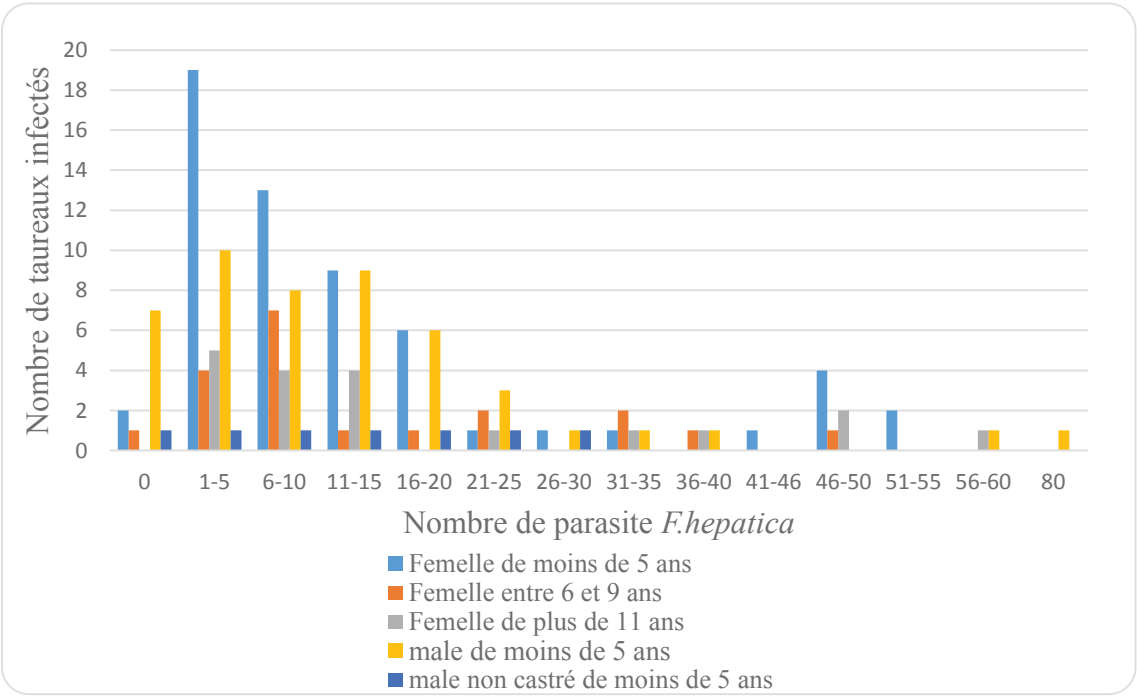


Figure 11 : Distribution parasitaire de *F.hepatica* chez les taureaux non traités.

La masse corporelle peut être utilisée comme un indicateur de la santé des bovins. Nous avons donc testé si l'intensité parasitaire, en contrôlant pour l'âge et le sexe avait un effet sur le poids. Nos résultats montrent que plus les individus sont vieux, plus ils sont lourds, ce qui est normal selon la courbe de croissance. Les individus lourds sont aussi les moins parasités. Au moins deux hypothèses peuvent être proposées : (i) les animaux les plus lourds, possède un meilleur système immunitaire induisant une charge parasitaire plus faible. (ii) Les animaux ont moins de parasites, leurs organismes allouent donc plus d'énergie à la prise de poids qu'à la défense contre les parasites.

Pour compléter ces analyses, il serait intéressant de prendre en compte la généalogie des bovins de la Tour du Valat. En effet, le poids et l'efficacité du système immunitaire ont probablement une composante héritable. Pour l'instant, cela n'a pas encore été fait car cela peut être compliqué d'établir la paternité dans les élevages extensifs.

Il serait aussi important de coupler l'inspection des foies avec d'autres méthodes de détection. Malheureusement le diagnostic par sérologie est difficile à mettre en place sur cette race. Toutefois, des analyses par coproscopie ou l'utilisation de kit ELISA pour la détection d'antigènes dans les bouses (Palmer et al., 2014) peuvent être utilisées afin d'avoir, non seulement la prévalence sur les individus abattus, mais aussi chez les jeunes animaux et sur l'ensemble du troupeau. Pour les résultats de coproscopie, ils doivent être interprétés avec prudence car l'excrétion des œufs de douves n'est pas régulière (Duwel and Reisenleiter., 1990).

Au niveau de l'exploitation, il est difficile de savoir si c'est l'impact du parasite qui a un effet sur la santé ou si c'est la faiblesse de l'individu qui joue sur sa charge parasitaire. Les jeunes et les vieux animaux semblent les plus parasités, ce qui nous donne une idée des individus à surveiller et à traiter si besoin. Il pourrait être judicieux de mettre au point un indice permettant d'estimer l'état de bonne santé des taureaux de Camargue. Dans la mesure où cette race est également utilisée pour les courses camarguaises, il serait intéressant que cet indice puisse inclure des données comportementales. Pour le moment, nous n'avons aucune idée de l'effet de la fasciolose sur la compétitivité des taureaux de courses, qui est un enjeu économique et culturel en Camargue.

Au-delà de la prévalence et de la charge parasitaire, la structure génétique et la circulation au sein d'un hôte et entre hôtes domestiques et sauvages est primordiale pour mieux prévenir et contrôler les impacts liés à la fasciolose. Afin d'avoir une meilleure vision du

système, comprendre la dynamique du parasite au sein de la manade en utilisant la génétique des populations, nous permet de déterminer s'il existe une circulation des parasites entre les lots, entre troupeaux et avec la faune sauvage.

III. Dynamique de la douve au sein de la manade non traitée

Notre deuxième objectif est de comprendre la dynamique de transmission des douves au sein de la manade de la Tour du Valat qui ne reçoit aucun d'antihelminthique. Pour cela, l'étude de la génétique des populations de douves, nous permettra de connaitre la structuration des douves et les échanges au sein du troupeau.

En effet, la génétique des populations fournit un moyen de comprendre certains processus des populations parasitaires tels que les modèles de dispersion, la démographie, les systèmes d'accouplement, la transmission, qui ont tous des implications importantes pour l'épidémiologie (Criscione et al., 2005; de Meeûs et al., 2007; Nadler, 1995). Plusieurs études ont montré que les pratiques d'élevage et de gestion des troupeaux peuvent affecter la structure des populations de parasites (Grillo et al., 2007). Il a été suggéré que les déplacements des hôtes définitifs est un facteur clé pour maintenir des niveaux élevés de flux de gènes chez *F. hepatica* (Bazsalovicsová et al., 2015; Semyenova et al., 2006). Cette hypothèse est étayée par les résultats de plusieurs études précédentes sur la génétique de *F. hepatica*. Par exemple, dans une étude de Vilas et al., (2012) en Espagne, la comparaison de la génétique des douves issues de moutons et de vaches a révélé une structure génétique beaucoup plus marquée chez les douves de moutons que chez celles de vaches. Les auteurs expliquent cela par le fait que les moutons étaient dans des zones de pâturage restreintes alors que les vaches laitières provenaient de plusieurs fermes et pâturaient sur de très grandes superficies. De plus, les échanges de bovins et le partage des prairies entre les fermes ne sont pas rares, de sorte que les vaches ont de nombreuses occasions de pâturer dans plusieurs champs partagés. Ces conditions facilitent la dispersion des parasites provenant de différentes fermes, ce qui augmente la probabilité d'un flux de gènes entre les populations géographiques proches. De même, à Cuba, (Vázquez et al., 2016) ont montré, dans la plupart des cas, une absence de différenciation entre localités chez des douves provenant de bovins et de buffles sur l'île de Cuba, où les transports d'animaux entre les différentes régions sont fréquents. Une autre étude en Grande Bretagne a montré qu'il n'y avait aucune structuration génétique entre les parasites de moutons et de bovins, indiquant une panmixie et un flux génétique élevé (N.

Beesley et al., 2017). Au Royaume-Uni, les animaux sont fréquemment déplacés et circulent entre régions, et il est probable que les mouvements de bétail au Royaume-Uni contribuent au flux génétique élevé observé. Même une faible dispersion peut annuler toute structure de population observée. Dans le contexte de la Camargue, nous devrions nous attendre à n'avoir dans un même élevage, aucune structuration et un flux de gène important entre les différents lots. En effet, les individus pâturent sur de grande surface et les veaux restent un an avec leurs mères, permettant des échanges de douves par la suite avec les autres lots.

Nos résultats indiquent que les populations de douves de la manade de la Tour du Valat sont à l'équilibre d'Hardy Weinberg, avec un F_{IS} moyen non significatif de 0,027 ± 0,07 SD, et un fort polymorphisme allélique (4 à 25 allèles par locus). Ces résultats sont indicateurs d'une prédominance de l'allofécondation dans ces populations de douves, ce qui est en accord avec les précédentes études (N. Beesley et al., 2017; Vazquez-Prieto et al., 2015; Vilas et al., 2012). De plus, nous n'observons pas dans ces populations de différenciation génétique (*F*ST moyen non significatif de 0,026 ± 0,03 SD) ni de structuration à l'exception de trois infra-populations taureaux qui sont significativement différenciées des autres. Tous ces résultats montrent qu'il n'y a aucune structuration génétique entre les infra-populations de douves, et qu'il existe un flux de gènes important entre les différents lots de l'élevage. Dans notre étude, ce flux de gènes peut-être attribué au fait que les bovins analysés appartiennent à la même race, et sont originaires de la même manade (Tour du Valat). Cependant, le mode de vie des animaux peut aussi grandement influencer le flux de gènes. Les bovins de la Tour du Valat pâturent toute l'année sur de vastes territoires (environ 4 taureaux par hectare), ce qui augmente l'exposition des individus à la fasciolose et favorise en l'absence de traitement leur infestation tout au long de l'année. Les individus fréquentent en effet plusieurs sources de contamination au fil du temps. Par ailleurs, nous observons très peu de clonalité et une très forte diversité génotypique : seulement 36 génotypes multilocus (GTLM) identiques pour 655 GTLM au total. Pour chaque GTML, plusieurs copies se retrouvent dans le même animal, mais certains sont aussi partagés par plusieurs bovins. Les bovins qui partagent les mêmes génotypes multiclonaux n'appartiennent pas forcément aux mêmes lots. Par exemple, un mâle et une femelle d'âge différent, abattus deux années distinctes peuvent héberger des douves de même génotype multilocus. Cette faible clonalité peut être expliquée par la longévité de *F. hepatica* chez les bovins qui est moins longue que

chez les moutons (Durbin et al, 1952). En effet, il a été montré qu'un mécanisme tardif de défense permettrait d'éliminer 80 % des douves installées dans les canaux biliaires 6 mois après l'infestation chez les bovins (Doyle, 1972). Il est donc possible que les animaux s'infestent tout au long de l'année, et à différents endroits au gré de la rotation des pâtures.

Il a été démontré que plus la diversité génétique des populations est importante, plus la probabilité de l'apparition de douves résistantes aux anti-helminthiques est élevée (Vázquez et al., 2016). Il est donc très important de comprendre les conséquences des traitements, à la fois sur les hôtes définitifs et sur la diversité de la douve.

IV. Dynamique de la douve entre des troupeaux traités et non traités

Notre troisième objectif est de mieux comprendre l'impact du traitement sur la dynamique du parasite dans les troupeaux en utilisant la génétique des populations et donc en comparant la structure de population du parasite entre troupeaux traités et non traités.

En élevage industriel, la lutte contre la fasciolose se fait essentiellement par l'utilisation de traitements antihelminthiques. Pourtant, la résistance aux antihelminthiques, en particulier au Triclabendazole (TCBZ) qui est le médicament le plus largement utilisé, est en augmentation (Beesley et al., 2017). Avant 2011, la résistance au TCBZ a été signalée dans le monde, chez des moutons et des bovins dans six fermes en Australie, en Écosse, au Pays de Galles, aux Pays-Bas, en Espagne et en République d'Irlande. Depuis, 24 autres fermes ont également signalé une résistance à cet anthelminthique en Irlande du Nord, en Écosse, au Pays de Galles, en Australie, en Nouvelle-Zélande, au Pérou et en Argentine (Kelley et al., 2016). D'autres antihelminthiques sont disponibles pour cibler les douves résistantes au TCBZ, par exemple le Clorsulon, le Nitroxynil, le Closantel, l'Albendazole ou l'Oxyclozanide (Kelley et al. 2016 ; Beesley et al. 2017). Mais seul le TCBZ est capable d'éliminer les stades immatures de la douve. Néanmoins, il est important d'utiliser des méthodes alternatives. En général, elles peuvent comprendre l'usage des traitements qui ne devraient pas être systématiques mais raisonnés pour éviter l'émergence de nouvelles résistances. Par exemple, la rotation annuelle des médicaments empêche habituellement le développement d'une résistance, en particulier si les

antihelminthiques appartiennent à des classes différentes et ont des mode d'action différents (Fairweather, 2011). Les agriculteurs peuvent également sélectionner les animaux à traiter. Ils peuvent traiter les animaux les plus vulnérables (par exemple, les plus jeunes) afin de réduire le nombre d'individus traités et donc la pression de sélection conduisant à la résistance. Toutefois, cela peut être difficilement applicable. En France, depuis 2013, trois molécules (Closantel, Nitroxil et Triclabendazole) ont été interdites pour les vaches laitières car il y avait des risques de présence de résidus de ces molécules dans le lait. L'unique molécule autorisée est maintenant l'Oxyclozanide pour les vaches laitières. Pour les autres élevages, l'utilisation de Closantel, Nitroxil, Triclabendazole ou encore d'Ozyclozanide est encore autorisés mais le délai avant l'abattage varie selon la molécule utilisée. En outre, la réglementation sur l'utilisation des antihelminthiques pourrait encore se durcir comme c'est le cas pour les antibiotiques.

En outre, de nombreuses molécules antiparasitaires ne sont que partiellement métabolisées lors de leur passage dans l'organisme de l'animal traité. Elles sont éliminées intactes ou sous forme de métabolites dans les fèces avec des concentrations variables. Ces composés peuvent se révéler nocifs pour la biodiversité en particulier pour l'entomofaune inféodée aux excréments comme certains coléoptères. Ces composés peuvent avoir des effets néfastes sur les traits d'histoire de vie de ces insectes (perturbation du développement, de la fécondité, mortalité) ;(Lumaret and Errouissi, 2002; O'Hea et al., 2010).

La comparaison d'élevages traités et non traités peut nous permettre d'identifier les effets du traitement sur la structure des populations de douves et aussi sur leur circulation. Dans un premier temps, Il est donc important de se demander si l'utilisation des traitements est réellement efficace dans l'élimination de la grande douve du foie dans les troupeaux. Pour cela, plusieurs troupeaux traités pâturant sur le domaine ont été étudiés. La prévalence de la grande du foie, dans les trois troupeaux traités est variable. Dans deux élevages, la dissection des foies a révélé l'absence de *F. hepatica* mais une forte prévalence en *D. dendriticum* (81 %, N =11 pour le troupeau Bon et 100 % (N=4) pour le troupeau Blanc). Pour le troupeau Mailhan, la prévalence en *F. hepatica* est de 66% (N=15) avec un nombre de parasites variant de 1 à 41 et la prévalence de *D. dendriticum* est de 25%.

Ces différences de prévalence peuvent être expliquées par une gestion de l'élevage qui diffère selon les éleveurs. Par exemple, dans le troupeau Blanc, les animaux sont jeunes et pâturent dans une zone où aucun gîte à limnée n'a été détecté.

Les analyses de génétiques des populations sont essentielles pour comprendre l'origine, l'évolution et la propagation des gènes de résistance dans les populations et sont donc une composante essentielle des études sur la résistance aux antihelminthiques (Gilleard and Beech, 2007). En effet, chez les élevages traités, on s'attend à de très forts goulots d'étranglement sur les populations de parasites et donc à une diversité amoindrie.

Afin de comprendre la circulation du parasite au sein du troupeau Mailhan et d'étudier la structure des populations de douves, nous avons donc utilisé la génétique des populations. Nos résultats indiquent que les douves y sont aussi principalement allofécondantes avec un Fis moyen de 0.068 ± 0,03 SD. La richesse allélique 4.36 (± 0,07 SD) chez les taureaux traités est significativement proche de celle des taureaux non traités (4.52 ± 0,09 SD). La diversité génétique est aussi élevée (0.74 ± 0.05 SD) pour les taureaux non traités et de (0.74 ± 0.05 SD) pour les taureaux traités. Cette diversité génétique importante pourrait s'expliquer par une faible pression de sélection par le traitement sur les populations de douves. En effet, les animaux peuvent se réinfecter quelques semaines après le traitement, car les foyers à risques sont toujours présents. Par contre, les douves des taureaux traités ne présentent pas de génotypes multiclonaux contrairement aux taureaux de la manade de la Tour du Valat et elles possèdent aussi plus d'allèles privés. Lorsque l'on calcule la richesse génétique en soustrayant les génotypes multiclonaux, la richesse génétique est donc légèrement plus élevée dans les populations de douves de la manade Mailhan avec une valeur de 1 contre une valeur de 0.9 pour la Tour du Valat, ce qui est contraire aux prédictions. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les taureaux ont pâturé pendant longtemps sur un autre territoire de Camargue avant de pâturer sur le domaine ; il est donc possible que certaines souches de douves issues de la manade Mailhan proviennent d'autres sites. Nous avons aussi observé une faible différentiation génétique entre les populations de douves de l'élevage traité et douves de la manade non traitée, avec un Fst significatif. Cette faible différenciation suggère l'existence d'un flux de gènes entre les deux élevages.

Pour confirmer ces résultats, il est essentiel de continuer le suivi des élevages traités qui pâturent sur le domaine de la Tour du Valat, afin d'avoir plus d'échantillons. Afin d'avoir une idée plus précise de l'impact de la fasciolose sur la santé des bovins mais aussi des traitements sur la génétique de la *F. hepatica*, il serait intéressant d'expérimenter, par exemple en ne traitant un sous échantillon d'un élevage non traité et inversement prendre

un sous échantillon d'un élevage qui traite les animaux et arrêter le traitement pour ainsi étudier l'évolution de la structuration du parasite.

Tous les élevages de Camargue pâturent sur un large domaine, les taureaux sont susceptibles de d'interagir fréquemment avec des points d'eau fréquentés par d'autres mammifères sauvages (e.g. ragondins et sangliers), ce qui ajoute une dimension supplémentaire dans la dynamique locale de la fasciolose.

V. Les échanges entre la faune sauvage et domestique

Notre dernier objectif pour ce chapitre est d'étudier les échanges de douves entre les différents compartiments hôtes, animaux domestiques traités et non traités et faune sauvage.

La faune sauvage a été identifiée comme un élément clé de la (ré)émergence et de la propagation des maladies dans les élevages de ruminants. L'expansion spatiale de certaines espèces, ainsi que le développement de l'urbanisation et les changements dans les systèmes agricoles (par exemple, l'augmentation de la taille des troupeaux domestiques et la diminution de la présence humaine dans les élevages (García-Martínez et al., 2009; Tatem et al., 2006) ont entraîné une augmentation des taux de contact entre la faune et le bétail et donc l'augmentation de l'échange des pathogènes entre les deux compartiments (Kruse et al., 2004).

Par exemple, une étude sur la transmission de la tuberculose en Angleterre a montré que les blaireaux, *Meles meles,* peuvent transmettre la tuberculose aux bovins. Une campagne d'abattage a alors commencé mais l'abattage des blaireaux induisait une dispersion beaucoup plus importante des populations, ce qui a entraîné une augmentation de la propagation de la tuberculose entre les bovins (Vicente et al., 2007). Cette opération a ainsi démontré que l'organisation sociale des populations de blaireau du sud-ouest de l'Angleterre est d'une importance primordiale dans la dynamique de la tuberculose bovine. La compréhension des relations entre le comportement spatial de la faune sauvage,

l'organisation sociale et la propagation des épidémies est essentielle pour comprendre la transmission des maladies (Marchand et al., 2017; Vicente et al., 2007).

D'autres exemples ont montré la complexité des interactions entre les parasites de la faune sauvage et des animaux domestiques et inversement. En outre, les animaux sauvages peuvent être porteurs sains pour plusieurs pathogènes qui peuvent s'avérer très virulents pour l'Homme ou la faune domestique. Par exemple, le buffle africain, *Syncerus caffer*, héberge des pathogènes comme le trypanosome africain et la théiériose qui ont des impacts considérables sur l'élevage (Michel and Bengis, 2012). De plus, l'introduction de maladies « exotiques » peut avoir des effets dramatiques sur la faune sauvage : les populations du même buffle africain ont été décimées entre 1889 et 1905 par le virus de la peste bovine introduit d'Asie (Moutou et al., 2014). Aujourd'hui, l'impact de la tuberculose bovine introduite en Afrique australe depuis l'Europe, sur les populations de buffles est une préoccupation majeure pour la conservation de cette espèce (Caron et al., 2012; De Garine-Wichatitsky et al., 2013).

La grande douve du foie est reconnue pour avoir une dispersion mondiale mais aussi une large variété d'hôtes définitifs sauvages comme des ragondins, des sangliers, des lièvres, des rats (Cuervo et al., 2015; Hurtrez-boussès et al., 2001; Mas-Coma et al., 2009; Walker et al., 2011). Plusieurs études ont montré des prévalences élevées dans la faune sauvage. En France, dans le département Loire Atlantique, approximativement 9% des ragondins sont infectés par *F. hepatica* (Ménard et al., 2001) et en Espagne, la prévalence chez les sangliers est de 11 % (Mezo et al., 2013).

Il est donc important de connaître le rôle de la faune sauvage dans le cycle de la fasciolose en Camargue. Sur le domaine de la Tour du Valat, les hôtes potentiels les plus communs sont les ragondins et les sangliers. Nous avons utilisé la génétique des populations pour étudier les échanges des souches de douves entre les hôtes définitifs domestiques et sauvages.

Sur le domaine de la Tour du Valat, nous observons une prévalence de 31 % chez les ragondins (N=57) et de 5% chez les sangliers (N=173). Le parasite *D. dendriticum* est aussi présent avec une prévalence de 50% chez les ragondins et une prévalence de 11 % chez les sangliers.

Comme pour les douves de la faune domestique, les douves de la faune sauvage sont principalement allofécondantes, avec un F_{IS} moyen de -0.082 ± 0.035 SD pour les

sangliers et de -0.269 ± 0.101 SD pour les ragondins. Les douves des taureaux traités et non traités ont une richesse allélique plus grande que les douves de la faune sauvage (figure 10). La diversité génétique est aussi plus grande chez les douves des taureaux non traités par rapport aux douves de la faune sauvage. Ainsi, les parasites présents chez la faune sauvage pourraient représenter un sous-échantillon des souches qui circulent chez les bovins.

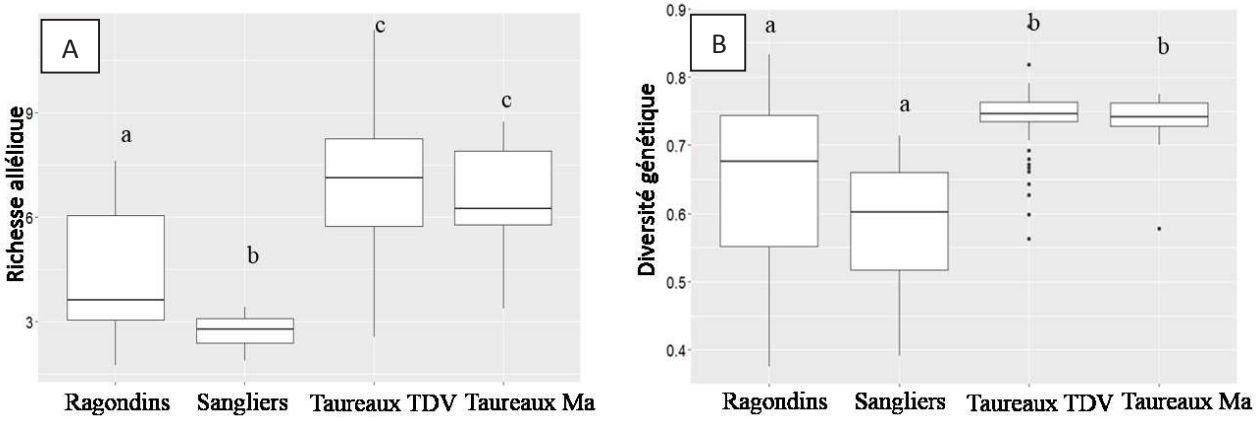


Figure 10 : Boxplot de la diversité génétique (B) et de la richesse allélique (A) selon le type d'habitat (permanent, semi-permanent, temporaire). La ligne du milieu représente la médiane, la ligne du haut est le 3e quartile et la ligne du bas le 1er quartile.

Un grand nombre de génotypes multiclonaux est retrouvé dans la faune sauvage mais on retrouve aucun des génotypes clonaux de la faune sauvage dans la faune domestique et inversement. Nos résultats indiquent aussi une faible différenciation génétique entre la faune sauvage et domestique, aucune différenciation n'est retrouvée entre les douves des sangliers et des ragondins. Cette différence dans les résultats pourrait s'expliquer par les modes de vie qui diffèrent entre la faune sauvage et les animaux domestiques. Les ragondins sont très territoriaux et ont une espérance de vie plutôt limitée (2 à 3 ans). Ils ne s'éloignent pas ou rarement de leur terrier (Carter and Leonard, 2002), ce qui limite leur capacité de dispersion. Leur faible longévité ne permet pas une accumulation importante de douves si on la compare à celle des taureaux. Pour les sangliers, la prévalence est très faible par rapport à celle des ragondins. Ils vivent en général sur un territoire de plus de 100 hectares (Boitani et al., 1994) et ils ont une longévité plus grande que celle des ragondins (jusqu'à 9 ans en Camargue). Deux hypothèses pourraient expliquer cette faible prévalence (i) les sangliers, par leur alimentation et les sites qu'ils fréquentent pourraient être moins soumis au risque d'infection et/ou (ii) ils pourraient être

plus résistants que les autres hôtes à l'infection par la fasciolose. En effet, le cochon domestique qui est une espèce très proche du sanglier a été montré comme possédant une résistance naturelle à *F.hepatica* (Ross et al., 1967, Nansen et al 1972).

A la vue de ces résultats, il semble donc que les bovins, avec une prévalence de 96%, soient les hôtes prépondérants de la douve du foie en Camargue. Si nos résultats se confirment avec de plus grands échantillons, les ragondins pourraient maintenir le cycle, notamment dans des zones moins fréquentées par les bovins. La faible prévalence observée chez les sangliers suggère que ces animaux ne sont pas des acteurs importants du maintien de la fasciolose en Camargue. En revanche, les sangliers pourraient avoir un rôle dans la dispersion du parasite car ils peuvent parcourir de grandes distances et ainsi participer à la circulation de la douve entre les troupeaux de bovins.

Message à retenir :

Cette étude sur la dynamique de la grande douve du foie chez ses hôtes définitifs, nous a apporté un éclairage sur sa circulation entre les différents hôtes.

Les bovins de la race *Raço di Biou* semblent tolérants à l'infection par la grande douve du foie. Les individus les plus susceptibles sont les jeunes et les vieux animaux. Les femelles infectées présentent aussi plus de parasites. L'efficacité du traitement semble aussi variée en fonction de la gestion du troupeau.

En accord avec les autres études, les douves sont allofécondantes, et ont une très grande diversité génétique. De plus, il existe un flux de gène très important entre les individus d'un troupeau car aucune structuration génétique n'a été identifiée entre les parasites.

La faible différenciation génétique entre troupeau traité, non traité et la faune sauvage indique un échange de gènes réguliers entre les différents hôtes définitifs.

Par ailleurs, l'étude de la faune sauvage nous suggére le rôle possible du ragondin dans le maintien du cycle et du sanglier dans la dispersion de la maladie.

Pour conclure, tous ces résultats indiquent l'existence de plusieurs sites de transmission sur le domaine qui pourraient être considérés comme un seul grand foyer global.

Ce chapitre permet de montrer l'importance d'étudier une maladie en prenant en compte tous ces hôtes définitifs. En effet, cette compréhension initiale de la dynamique de la maladie peut permettre la mise en place d'une gestion intégrée de *F.hepatica*.

Discussion générale

I. Une nouvelle approche, la gestion intégrée adaptative

L'enjeu de cette thèse a été de montrer l'importance d'étudier une maladie en prenant en compte tous les compartiments, c'est-à-dire les hôtes définitifs, les hôtes intermédiaires, les caractéristiques de l'environnement et les pratiques de gestion. En effet, nous avons réalisé un état des lieux de l'impact et de la dynamique de la fasciolose en Camargue entre les différents compartiments grâce à l'utilisation de plusieurs outils tels que l'écologie parasitaire et la génétique des populations. Nos résultats ont démontré l'importance des caractéristiques de l'habitat et de la structure et la dynamique du réseau hydrographique dans la structuration des populations de l'hôte intermédiaire. Nos résultats sur l'étude de l'hôte définitif domestique, suggèrent l'existence sur le site d'étude de plusieurs sites de transmission qui pourraient être considérés comme un seul grand foyer global. En effet, aucune structuration génétique n'a été identifiée entre les parasites des différents lots de taureaux, ce qui indique un flux de gène important entre les individus. De plus, la faible différenciation génétique avec l'autre troupeau traité montre aussi un échange de gènes entre les deux. Par ailleurs, l'étude de la faune sauvage nous a permis de suggérer le rôle possible des sangliers dans la dispersion de la maladie et le rôle des ragondins dans le maintien du cycle de la fasciolose. Notre étude s'est faite à une échelle très fine dans un territoire précis mais il serait possible d'étendre ce type d'approche à l'échelle de la Camargue.

I.1 Une surveillance accrue pour éviter

Cette compréhension initiale de la dynamique de la maladie va aider à mettre en place à l'avenir une gestion intégrée de la fasciolose. En effet, ce travail constitue une base pour pouvoir optimiser la surveillance de la maladie dans les différents compartiments. Comme nous l'avons montré la surveillance de la faune sauvage est essentielle pour la compréhension de la circulation du parasite ; il est donc important de continuer son suivi sur les animaux abattus mais aussi en utilisant des tests diagnostiques coproscopiques. La surveillance de l'état de santé des troupeaux doit être aussi intensifiée en notant l'apparition de certains signes comme l'amaigrissement, un changement de couleur du poil, une augmentation de la mortalité et une chute de fertilité. Ce suivi pourra être complété avec des analyses coprologiques sur l'ensemble des lots traités et non traités, car dans un élevage atteint de fasciolose, tous les animaux peuvent ne pas être soumis aux mêmes risques d'infestation. Les analyses coprologiques permettront d'observer la

présence d'autres maladies qui peuvent aussi avoir un impact sur les bovins. En effet, chaque individu hôte doit faire face à tout un cortège d'espèces parasites qui défient son système immunitaire et peuvent exploiter les mêmes ressources au sein de l'organisme. De plus, dans le cas des parasites à cycles complexes, le problème des co-infections peut se poser à chacune des étapes du cycle. S'intéresser aux risques épidémiologiques ne peut donc pas se limiter à l'étude d'un seul système hôte-parasite, mais doit s'attacher à comprendre la diversité des hôtes et des parasites, ainsi que leurs dynamiques dans un environnement variable, dans l'espace et dans le temps. Ainsi, des examens coprologiques en Camargue, on déjà montré la présence de plusieurs espèces de strongles, de *D dendritricum* et de paramphistome (Paramphistomum daubneyi). Néanmoins, les bovins sont souvent tolérants aux parasitoses notamment vis à vis des strongles gastrointestinaux. En effet, il est communément admis qu'à l'issue de leur première saison de pâturage, les bovins ont développé une immunité protectrice pour la plupart des espèces de strongles (Ravinet et al, 2014). Toutefois, les jeunes animaux peuvent être plus sensibles aux infections, des symptômes cliniques peuvent apparaitre lorsque les charges parasitaires sont élevées (Armour et al., 1979, Shaw et al., 1998). Pour *D. dendriticum*, les symptômes sont similaires à ceux de la grande douve du foie (Otranto and Traversa, 2003). D'après nos résultats, beaucoup d'animaux sont co-infectés par *D. dentriticum* et *F. hepatica ;* il serait donc intéressant d'observer l'impact de *D. dendriticum* chez les taureaux traités qui sont indemnes de grande douve du foie. Par ailleurs, la compétition entre *D. dendriticum* et *F. hepatica* pourrait être étudiée. En effet, ces deux parasites colonisent le même organe : une forte charge parasitaire en *F. hepatica* pourrait empêcher l'installation de *D.dendriticum* (ou limiter) et inversement. Le paramphistome est aussi en compétition avec *F. hepatica* pour l'infection de l'hôte intermédiaire (Abrous et al., 1999; Dreyfuss et al., 2014; Mage et al., 2002). On s'attend donc à ce que dans les zones où sont utilisés des traitements contre *F. hepatica*, la prévalence soit plus forte chez les limnées et, par répercussion, chez les hôtes définitifs. De plus, l'infestation avec paramphistome est cumulative au cours des saisons et des années : plusieurs centaines à milliers de parasites peuvent ainsi s'accumuler dans la panse (Alzieu and Dordchies, 2012). La longévité du parasite peut aller jusqu'à 5 à 7 ans. Cependant, on peut observer certains symptomes lors de forte infestation comme l'amaigrissement des animaux (Huson and Bryant, 2006). Pour avoir une idée globale de la dynamique de la fasciolose et des conséquences de son contrôle, l'impact de *P. daubneyi* sur les troupeaux devrait être pris en considération, tout comme celui de *D. dicrocoelium.* De plus, la surveillance de la prévalence des

paramphistomes et de *F. hepatica* chez les limnées, en identifiant les habitats et les sites les plus à risques doit être complémentaire du suivi des bovins. La surveillance du comportement des bovins en étudiant leur déplacement, leurs sites de nourrissage et d'abreuvement dans la journée pourrait aussi aider à identifier les habitats à risques. Des GPS pourraient être posés sur les vaches qui déclenchent le mouvement des troupeaux ; un suivi des déplacements des sangliers et ragondins permettrait de plus d'avoir plus d'informations sur la fréquence des contacts entre faune sauvage et animaux domestiques. Cette méthode a déjà été utilisée pour une étude en Afrique sur la dynamique de la Fièvre aphteuse entre des populations de bovins et de buffles (Miguel et al., 2013). Cette étude a été réalisée afin de fournir des solutions novatrices pour améliorer la gestion de la fièvre aphteuse, en adoptant une stratégie permettant de cibler les zones et les périodes à risque.

Par ailleurs, un suivi temporel de l'épidémiologie de *F. hepatica* pourrait être mis en place. Ceci pourrait être réalisé en combinant (i) des modèles mathématiques de transmission et/ou des systèmes de prévision (Baggenstos et al., 2016) et (ii) des études longitudinales pour suivre l'évolution de l'infection à *F. hepatica* dans le temps, au cours des saisons. Des systèmes de prévision du risque d'infection de *F. hepatica* basés sur les corrélations de la température et des précipitations avec les épidémies sont disponibles depuis longtemps dans certains pays (par exemple, au Royaume-Uni et aux Pays-Bas (Gaasenbeek et al., 1992; Ollerenshaw, 1966). Ces systèmes de prévisions ont montré leur efficacité et, avec les problématiques liées aux changements climatiques, ils ont suscité un intérêt renouvelé.

I.2 La prévention du risque de la fasciolose

Un autre volet crucial dans la gestion intégrée est la prévention du risque. La limitation des accès aux sites identifiés comme les plus à risque et la création de zones-abreuvoirs exemptes de vecteurs est essentielle afin de limiter les contacts entre les hôtes intermédiaires et les hôtes définitifs. Par ailleurs, depuis plusieurs années, de nombreuses méthodes ont été testées pour lutter contre les lymnaideaes. Toutefois, que ce soit le contrôle biologique avec l'utilisation de compétiteurs ou de prédateurs ou encore l'utilisation de mollusquicides (Rondelaud et al., 2009a, 2006; Torgerson and Claxton, 1999), ces méthodes se sont révélées relativement peu efficaces, et dans la plupart des cas, les limnées ont réussi à recoloniser les milieux rapidement (Chlyeh et al., 2006). Une autre technique utilisée est l'asséchement des prairies (Johannes Charlier et al., 2014a) ;

mais elle n'est pas envisageable dans la zone humide protégée que constitue la Camargue. Cependant, il serait possible d'envisager une meilleure gestion de l'eau en réparant les ouvrages abimés ou les fuites qui permettent l'approvisionnement de certaines mares temporaires et donc le maintien des populations de limnées potentiellement vectrices.

En termes de prévention, l'utilisation de plantes peut être exploitée de façon traditionnelle comme avec des remèdes de phytothérapie, issus de l'ethnomédecine vétérinaire (Hart, 2005; Rochfort et al., 2008). En outre, certaines plantes que l'on trouve à l'état naturel dans les milieux camarguais, peuvent présenter un rôle vermifuge chez les bovins, telle que la carotte sauvage (graines et racines), le fenouil (*Foeniculum vulgare*), l'aigremoine (*Agrimonia eupatoria*) ou la moutarde (*Sinapis alba, S. arvensis, Brassica nigra*) (PNR Camargue, 2011). Ces plantes sont citées comme des remèdes qui permettent de stimuler l'immunité des jeunes animaux et d'éviter la prolifération des parasites (Heitz and Delbeque, 2007). Une quantité suffisante de plante (donc de substances actives) doit alors être ingérée pour atteindre cette propriété. A contrario, une surconsommation de certaines de ces plantes peut provoquer un effet de toxicité sur les animaux, pouvant dans certains cas conduire à la mort (PNR Camargue, 2011). Les animaux ont toujours sélectionnés les plantes disponibles dans leur environnement, pour leur alimentation, en fonction de leurs besoins et de leur état de santé (Engel, 2002; Shurkin, 2014; Villalba et al., 2014). Les races rustiques ont toujours cette capacité d'adapter leurs alimentations à leurs besoins, si toutefois le milieu pâturé leur en donne la possibilité (Villalba et al., 2014). Il faut donc préconiser le changement fréquent des pâtures pour que les animaux puissent bénéficier d'une alimentation variée et assez riche tout au long de l'année mais aussi avoir une densité raisonnée de taureaux pâturant au même endroit. Toutefois, les individus les plus à risque tels que les plus jeunes ou les plus vieux, pourraient être supplémentés par exemple avec l'utilisation de nutricaments (aliments généralement riches en métabolites secondaires, distribués aux animaux pour leurs qualités nutritionnelles mais aussi pour prévenir certaines infections) (Andlauer and Fürst, 2002). Quelques études prometteuses sur la complémentation par des nutricaments riches en tanins ont montré des propriétés antihelmintiques contre les nématodes gastro-intestinaux (Hoste et al., 2006). Ces tanins sont souvent abondants dans les plantes ligneuses ainsi que dans certaines légumineuses. Les nutricaments permettent d'apporter des plantes riches en métabolites sous forme de foin sans modifier la composition de la biodiversité végétale locale par l'apport d'espèces exotiques (PNR Camargue, 2011).

I.3 Une utilisation des traitements non systématique

Le dernier volet de la gestion intégrée adaptative est l'utilisation des traitements anti-helminthiques, sachant que l'arrêt total des traitements n'est pas forcément la solution acceptée par les éleveurs. Il serait possible de raisonner ces traitements en ciblant les animaux les plus sensibles après examen coproscopique ou encore les animaux présentant un impact économique important comme les taureaux participant aux courses. Le traitement systématique en aveugle de tous les animaux n'est pas forcément nécessaire, d'autant qu'il est souvent la cause des résistances aux anti-helmintiques. Par ailleurs, de nombreux traitements ont des effets néfastes sur l'environnement (Lumaret and Errouissi, 2002; O'Hea et al., 2010). De plus, le territoire camarguais, au climat humide et doux, composé de nombreuses zones humides est propice au développement des parasites. Le risque d'infestation est présent quasiment toute l'année, contrairement à d'autres régions de France (PNR Camargue, 2011). D'autres régions de France comme la région centre présentent des prairies humides favorisant la maladie dans les troupeaux mais les animaux sont rentrés à l'étable durant l'hiver, contrairement aux troupeaux de Camargue. En ne traitant qu'une fois par an pendant l'hiver, les traitements permettent d'assainir les animaux, mais dans le contexte Camarguais, ils peuvent se réinfester juste après la fin de l'action du traitement. De plus, il a été montré que les traitements contre la fasciolose favorisent d'autres parasites comme le paramphistome. En effet, la paramphistomose semble être apparue dans les zones d'élevages de vaches allaitantes, plus précocement que dans les zones de vaches à lait (Alzieu and Dorchies, 2012). Cela pourrait être lié à l'utilisation plus importante des douvicides stricts dans les troupeaux allaitants tandis que les troupeaux laitiers utilisent l'Oxyclozanide, qui présente aussi un effet contre les paramphistomes (Alzieu and Dorchies, 2012). Le traitement contre les douves donne donc la possibilité à d'autres parasites d'infecter les troupeaux. Cependant, le traitement des autres maladies peut être difficile : plusieurs résistances aux anthelminthiques ont été montrées chez les strongles (Kaplan, 2004), il existe très peu de traitements efficaces contre les paramphistomes (Huson et al., 2017) et pour *D. dentriticum*, il faut souvent utiliser des doses plus importantes et régulières au risque d'augmenter les cas de résistance (Otranto and Traversa, 2003).

I.4 Travailler ensemble pour une meilleure gestion

La sensibilisation des éleveurs est aussi nécessaire pour que la gestion intégrée puisse s'appliquer. Durant ma thèse, deux réunions ont été réalisées avec les éleveurs et une réunion sera faite après ma soutenance afin de leur présenter mes résultats. Les quatre éleveurs étaient familiarisés avec le cycle de la douve. Deux éleveurs voulaient arrêter les traitements mais des idées reçues bien ancrées les en dissuadaient pour le moment. Un des éleveurs, influencé par son vétérinaire pensait qu'avec l'arrêt des traitements le troupeau tomberait malade. Pour les autres, la plus grosse préoccupation était la réussite des taureaux aux courses camarguaises, avec l'idée que la fasciolose rendrait les taureaux plus faibles et moins agressifs. Ces échanges montrent l'importance de la relation avec les vétérinaires, les conseillers en élevage et aussi celle de la pression économique et culturelle que subissent les éleveurs. Mettre en place une étude sociologique auprès des vétérinaires et des éleveurs pourraient permettre d'identifier les freins à la mise en place de ces pratiques de traitement raisonnées. Ceci permettrait par la suite de proposer des offres de formation pour renforcer les connaissances en épidémiologie parasitaire des vétérinaires et concevoir et diffuser des outils de sensibilisation aux risques épidémiologiques adaptés pour les éleveurs. Un suivi plus complet des troupeaux et des conseils sur la gestion des élevages par les vétérinaires s'apuyant sur la création d'arbres décisionnels permettraient de mieux accompagner les éleveurs. Il semble donc important que scientifiques, éleveurs, vétérinaires et décideurs travaillent ensemble et se concertent, en vue d'un contrôle efficace et durable de la fasciolose mais aussi des autres maladies infectieuses des bovins.

Pour finir, le défi du contrôle de la fasciolose ne peut être relevé que si nous traitons les interactions complexes entre l'environnement, les hôtes définitifs, les hôtes intermédiaires et le parasite. La gestion intégrée adaptative semble être la meilleure solution dans ce contexte. En effet, si le système est équilibré et cohérent, avec l'utilisation de races rustiques locales, une surveillance de tous les compartiments, une bonne gestion de l'élevage et de l'eau, une alimentation complète, une densité d'animaux adéquate et l'utilisation des traitements ciblés, il pourrait permettre de diminuer l'impact de la fasciolose en Camargue mais aussi de prévenir les autres maladies. De plus, l'application d'un programme de lutte intégrée a déjà fait ses preuves contre d'autres maladies telles que celles associées aux les strongles gastro-intestinaux (Bélanger et al., 2007; Hoste and Torres-Acosta, 2011; Moule, 2009).

II. Connaître les activités humaines du passé pour préparer l'avenir

Le contexte socio-économique et écologique de la zone d'étude doit être pris en compte pour prévenir efficacement la fasciolose. La gestion doit donc être adaptée à chaque pays, région et même chaque exploitation. Il peut être difficile d'appliquer les mêmes conseils dans des régions ayant des gestions de l'élevage et des habitats différents. Ces conseils doivent pouvoir être adaptés face aux changements dans le temps des pratiques d'élevages, de l'utilisation des terres mais aussi face aux futurs impacts des changements climatiques. En effet, à l'instar de l'ensemble des régions françaises, depuis un siècle, la Camargue est en constante mutation et a subi des modifications profondes de son territoire, du fait des aménagements liés aux activités humaines. Par exemple, entre la fin de la deuxième guerre mondiale et les années 80, la surface des milieux naturels est passée de 100 000 ha à 60 000 ha pour la « mise en valeur » des terres pour les besoins de la saliculture, de l'agriculture et de l'élevage (Blondel et al., 2013). Tous ces changements ont pu modifier la transmission de certaines maladies dont la fasciolose au cours de l'histoire. L'utilisation des terres, le prélèvement par la chasse, l'urbanisation, les modifications des pratiques d'élevages, sont autant d'activités humaines qui influencent l'évolution des pathogènes à travers de multiples mécanismes (Lebarbenchon et al., 2008). Ces modifications peuvent augmenter le taux de transmission de certains pathogènes mais aussi diminuer la transmission d'autres (Ezenwa and Jolles, 2015; Morse, 1995; Smith and Guégan, 2010; Wolfe et al., 2007). Il est donc important d'avoir une vision des modifications du passé pour pouvoir prévenir au mieux les risques à venir.

II.1 Les modifications des pratiques d'élevages

Des changements dans les pratiques d'élevages ont eu lieu au cours du 20^{e} siècle en Camargue. Avant le 19^{e} siècle, des grands troupeaux de moutons étaient élevés pour la laine et pâturaient dans toute la Camargue. Après la seconde guerre mondiale, c'est le déclin de l'élevage ovin s'expliquant essentiellement par l'essor de la riziculture mais aussi par la crise du prix de la laine (Fabre., 2013). Parallèlement, l'élevage extensif de taureaux de la race locale dite R*aço di biou* et de chevaux, a connu une progression importante avec le développement des jeux taurins et des courses camarguaises (500 taureaux en 1820, 3500 en 1977, plus de 20000 aujourd'hui) (Mailhan et Colombaud., 2013). Ces premiers changements dans les pratiques d'élevages ont pu engendrer un

déséquilibre dans la transmission de la fasciolose. En effet, les moutons et les bovins n'ont pas la même sensibilité à l'infection par *F. hepatica*. Le mouton est considéré comme très sensible à l'infestation par rapport aux bovins (Haroun and Hillyer, 1986). Chez le Mouton, en Europe, le taux d'installation après une première infestation varie de 16 à 38 % alors que le taux d'installation des douves est de 5 à 15 % chez les bovins (tous âges confondus) (Chauvin et al., 2007). Toutefois, des différences de sensibilité à *F. hepatica* au sein d'une même espèce hôte ont déjà été observées, les jeunes bovins étant généralement plus sensibles que les individus adultes.

De nombreux échanges et croisements entre la race de taureau locale et les taureaux de combat espagnols ont été réalisés à la fin du 19^{e} siècle. En même temps, la race de mouton locale, le Mérinos d'Arles est croisée avec les Merinos d'Espagne pour augmenter la qualité de la laine (Duclos, 2013). Chaque année, des transhumances s'effectuaient en direction du massif alpin mais aussi dans tout le delta du Rhône. Tous ces échanges entre pays ou entre régions, ont pu permettre des échanges de souches de douves entre troupeaux. En effet, il a été montré que le commerce d'animaux entre fermes peut contribuer à la propagation de la fasciolose (Martins et al., 2014; Olsen et al., 2015). A plus vaste échelle, l'expansion de la fasciolose dans le monde a probablement été façonnée par l'exportation continue de bétail (Fürst et al., 2012). Aujourd'hui, on retrouve deux races de taureaux en Camargue qui composent le cheptel camarguais sur environ 39000ha : la race R*aço di biou* et la race T*oros bravos* et des hybrides entre les deux ; on note aussi le retour de quelques troupeaux de moutons dans la région (Mailhan et Colombaud., 2013).

II.2 Les modifications dans les communautés

Les pratiques d'élevages ne sont pas les seules évolutions en Camargue : la faune sauvage camarguaise a aussi beaucoup varié depuis plusieurs siècles. Certaines espèces natives se sont raréfiées, d'autres ont connu un spectaculaire accroissement démographique tandis que des espèces invasives se sont propagées sur tout le territoire (marte, ragondin, fouine). Il est possible que ces modifications des communautés d'espèces sauvages en partie dues aux activités humaines aient modifié la dynamique de transmission de la fasciolose.

En effet, toutes les espèces ne sont pas aussi **compétentes** dans la transmission de la fasciolose. Par exemple, le lapin de garenne (*Orcyctolagus cuniculus)* est considéré

comme étant une espèce moins compétente pour transmettre la fasciolose que le ragondin (voir par exemple l'étude de Ménard et al., 2001, 2000 en Loire Atlantique). De plus, le mode de vie et les habitats diffèrent entre les deux espèces : tandis que les lapins fréquentent des zones plus sèches, les ragondins vivent au bord de l'eau et peuvent ainsi plus facilement disséminer les œufs de douves près des habitats des hôtes intermédiaires. *Myocastor coypus* est aussi plus opportuniste : sa présence a été observée dans des biotopes humides très variés et ce qui a permis son invasion dans toute la France. En effet, il a été introduit en France au 19ème siècle en vue de l'exploitation pour sa fourrure. L'emploi d'enclos inadaptés a permis l'évasion et l'installation dans les habitats naturels de beaucoup de ces animaux. La date d'introduction exacte du ragondin en Camargue est imprécise, mais il est devenu extrêmement commun dans les années 1970. Le ragondin est depuis continuellement piégé et tiré pendant la période de chasse (Bayle, 2010). Cela n'a pas empêché la population d'accroître ses effectifs dans le delta, pour atteindre 400 000 individus en 2005 (Costa, 2005). Le ragondin a envahi la Camargue alors que plusieurs espèces de lagormorphes ont quasiment disparu à l'heure actuelle sur le territoire camarguais.

Ainsi, le Lapin de garenne, est devenu une espèce rare dans son habitat naturel, la Camargue. Un autre lagomorphe ayant totalement disparu est le Lièvre européen (*Lepus europaeus*), espèce qui semble être plus compétente que le lapin de garenne pour transmettre la fasciolose. En effet, d'après (Walker et al., 2011), elle peut jouer un rôle dans la dispersion la fasciolose entre les bovins. La disparition de ces deux espèces a donc pu jouer un rôle important dans la dynamique de la maladie en Camargue. La disparition du lapin de garenne est essentiellement due en grande partie à l'Homme. Avec dans un premier temps, l'introduction du virus de la myxomatose par l'Homme et sa propagation dans tout le territoire français. Les populations se sont soudainement effondrées. En l'espace de quelques mois, la maladie a décimé la population de lapin en Camargue (Olivier et al., 2010). Les populations reprennent doucement, puis, c'est l'arrivée du VHD (viral haemorrhagic disease) en Camargue. Cette maladie a très probablement contribué à l'effondrement des populations de lapins (Villafuerte et al., 1994). Les prélèvements de lapins ont chuté de 90 % dans les cinq années qui ont suivi l'arrivée de ce virus. Actuellement le niveau de prélèvement est très faible. Conjugué à l'effet des deux **épizooties**, il est probable que d'autres facteurs aient contribué localement à la fragilisation des populations de lapins en Camargue comme le braconnage pratiqué de

façon intensive par furetage jusqu'en 2003. La disparition du Lièvre européen (*Lepus europaeus*) serait due à la pression de chasse plus forte pendant les épisodes de myxomatose chez les lapins. Les rares observations réalisées ces dernières années pourraient provenir d'animaux issus de lâchers (Olivier et al., 2010).

En comparaison, le sanglier a connu une véritable explosion démographique. En effet, cette espèce n'était plus présente en Camargue au 18^{e} siècle, puis elle est réapparue à la fin du 19e siècle et est devenue progressivement abondante à partir des années 1960-1970. Les prélèvements de sangliers réalisés lors de battues en Camargue ont été multipliés par cinq depuis 1992. L'accroissement des effectifs en Camargue a sans doute plusieurs origines : augmentation du nombre et de la superficie des réserves, tendance à la fermeture des milieux, gestion cynégétique favorisant cette espèce (création de remises pour pouvoir les chasser en battues, agrainage et lâchers possibles à certaines époques) (Olivier et al., 2010b) Ces mesures cynégétiques peuvent avoir des conséquences sanitaires et favoriser les épizooties, notamment à cause de l'augmentation de la densité des animaux ou encore de l'augmentation des taux de contacts entre les hôtes du à l'agrainage (Castillo et al., 2011; J. Vicente et al., 2007). Il est aussi probable que cet accroissement de la population ait eu un effet dans l'expansion de la fasciolose sur le territoire camarguais, en favorisant la dispersion des limnées (Vanschoenwinkel et al., 2008) et en disséminant des oeufs du parasite sur de grandes surfaces.

Ces exemples montrent l'impact que l'Homme peut avoir sur les communautés d'hôtes et, en conséquence, sur la circulation des maladies. Ces changements dans la distribution de la faune sauvage suggèrent une modification de la dynamique et des acteurs jouant un rôle dans la transmission de la fasciolose sur le territoire Camarguais au cours du siècle dernier.

II.3 Les modifications de l'utilisation des terres

Parmi les activités humaines, le changement dans l'utilisation des terres peut aussi participer aux modifications dans la transmission de la fasciolose. Nos travaux ont montré que l'habitat a une influence sur la génétique des populations de limnées et que la dispersion de ces mollusques est aussi influencée par l'habitat. Le paysage camarguais est aujourd'hui morcelé par une multitude de canaux d'irrigation et de drainage associés à une extension des rizières ; le recours à ces systèmes a entraîné une augmentation des entrées d'eau douce. Les nouveaux besoins en eau pour l'agriculture ont aussi banalisé

certains habitats, en inversant certains cycles naturels locaux de l'eau, réduisant l'instabilité des milieux (Blondel et al.,2013). Ces nouveaux habitats d'eau douce plus stables ont été colonisés par de nombreux vertébrés et invertébrés aquatiques, dont les limnées. Ces habitats ont permis l'installation de populations de limnées présentes toute l'année et ayant une grande diversité génétique. Ces mollusques peuvent se disperser facilement dans les autres habitats permanents via le dense réseau de canaux mais aussi dans les habitats temporaires comme les mares via le transport animal et les inondations (Hurtrez-Boussès et al., 2010; Vanschoenwinkel et al., 2011). Les mares temporaires de Camargue sont de superficies variables et sont souvent asséchées pendant la période estivale. Certaines sont naturelles, d'autres peuvent être creusées par l'Homme soit en conséquence indirectes d'emprunts (prélèvements de matériaux), soit pour des objectifs liés à la conservation de la biodiversité. Ces habitats sont aussi propices aux limnées ; il est possible qu'ils augmentent le risque de fasciolose en étant plus accessibles aux bovins que les roubines. De plus, dans certains élevages, la pratique de l'inondation temporaire des prés est utilisée pour augmenter la productivité fourragère. Cette activité permet la connexion entre habitats temporaires et permanents, facilitant la dispersion des limnées. Tous ces aménagements hydrauliques peuvent donc participer à l'augmentation locale du risque de transmission de la fasciolose.

Malgré tous ces changements, la fasciolose n'est pas connue comme une maladie émergente chez l'Homme en Camargue. Cependant, par le passé, dans le reste de la France, des épidémies ont eu lieu à de nombreuses reprises après ramassage de cresson dans des créssonnières sauvages ou contamination de cresson cultivé (Houin, 2009). Ces épidémies ont amené à mettre en place des mesures de prévention et aussi de sensibilisation auprès de la population pour éviter la cueillette sauvage. La dernière épidémie connue à ce jour est celle de 2003 dans le Pas de Calais (INVS, 2003). Actuellement, les cas sont très peu fréquents (une à quelques dizaines par an) en France. La sensibilisation et les changements dans les habitudes alimentaires et les traditions au fil des années ont donc permis de diminuer le risque de transmission chez l'Homme.

III. La Camargue, une région en constante évolution

Aujourd'hui, la Camargue est toujours en mutation, avec des changements récents dans les pratiques d'élevage ; le nombre de manifestations taurines est en régression et donc les revenues associées diminuent aussi. Des races moins rustiques, plus productives en

viande sont désormais élevées en Camargue (Angus et Limousine). Ces races non locales pourraient moins supporter les fortes pressions parasitaires de cet environnement. De plus, la Camargue n'est pas épargnée par le changement climatique. Celui-ci pourrait avoir des conséquences importantes sur l'avenir du littoral Camarguais, engendrant des modifications profondes dans l'utilisation des terres et la gestion de l'eau. Par exemple, une augmentation des entrées d'eaux salées dans les terres est attendue, diminuant la surface dévolue à la riziculture, trop gourmande en eau. Les pratiques d'élevage pourraient encore changer. Par exemple en développant l'élevage ovin, plus adapté à des habitats plus salés. Néanmoins, de nombreuses incertitudes existent encore sur les impacts épidémiologiques réels des changements climatiques. C'est pourquoi il est essentiel de renforcer la surveillance des maladies infectieuses, en relation avec les changements climatiques en cours. En Europe, des systèmes de surveillance pour l'évaluation des effets des changements climatiques sur l'épidémiologie de *F. hepatica* ont suscité un élan d'intérêt depuis quelques années. Par exemple, Caminade et al. (2015) ont appliqué des scénarios de changement climatique à un système de prévision existant. Ces auteurs ont ainsi montré que le changement climatique pourrait entraîner une augmentation significative du risque d'infection dans la plupart des régions d'Europe, avec une prolongation de la saison de transmission pouvant atteindre quatre mois en Europe du Nord. Toutefois, lorsqu'ils sont utilisés pour prévoir à court terme l'apparition d'une maladie, les systèmes de prévision décrits sont propres à chaque région. Ils ne peuvent pas en tant que tels être extrapolés à d'autres régions parce qu'ils ne rendent pas explicitement compte de la dépendance du cycle de vie de *F. hepatica* aux facteurs environnementaux clés (Johannes Charlier et al., 2014b). Il faut donc développer et valider des nouveaux modèles mathématiques, en prenant en compte les effets des conditions environnementales sur la survie des œufs, des métacercaires et des hôtes intermédiaires dans les pâturages dans différents contextes géographiques. Par exemple, en Camargue, la salinité des eaux est un facteur clé qui n'entre pas en compte dans d'autres régions françaises.

IV. Conclusion : une nouvelle approche des maladies parasitaires, travailler à la réduction des impacts plutôt qu'à l'éradication

Nos travaux illustrent les enjeux de la compréhension de la dynamique de la fasciolose au sein de l'ensemble des compartiments où elle circule. Ils soulignent l'intérêt des études

menées sur le long terme et à des échelles locales. La gestion des risques parasitaires associés à la circulation des pathogènes ne passe pas nécessairement par leur éradication, mais par de nouvelles formes de contrôle et de surveillance prenant en compte le rôle des activités anthropiques. Ces nouvelles approches émergent suite à la constatation de l'échec du contrôle systématique des agents pathogènes. Cet échec est notamment illustré par l'émergence de résistances aux traitements qui constituent, non seulement un problème vétérinaire majeur, mais aussi un problème pour la santé humaine. Ces nouvelles formes de gestion du risque sanitaire nécessitent une connaissance fine de l'épidémiologie des pathogènes émergents, impliquant une étroite collaboration entre vétérinaires, éleveurs, agriculteurs, scientifiques, décideurs et gestionnaires des espaces naturels. Malheureusement, la situation actuelle nous montre que cette collaboration entre les différents acteurs peut être complexe et qu'il est difficile de mettre en place ces modes de gestion. La vulgarisation du travail scientifique n'est pas suffisante ; le travail de médiation et le changement des pratiques sont cruciaux pour que ces méthodes soient mises en place de manière effective. Des approches sociétales et économiques couplées à une gestion intégrée ont permis la diminution de l'impact et du risque de transmission de certaines maladies humaines. Il serait donc intéressant de pouvoir appliquer les mêmes approches aux maladies épizootiques. Beaucoup de maladies épizootiques sont devenues émergentes chez l'Homme ; un contrôle efficace pourra donc permettre de limiter le risque d'épidémie mais aussi le développement des résistances aux biocides (antibiotiques et antihelminthiques notamment) qui pourrait avoir à terme un effet désastreux sur la santé humaine et vétérinaire.

Les parasites font partie intégrante de la biodiversité. De plus en plus d'études ont démontré leurs implications dans le fonctionnement des écosystèmes et dans l'évolution des organismes. Il faut donc apprendre à vivre avec eux en limitant leurs impacts et changer les moyens misent en place pour les éradiquer. En effet, leur éradication est généralement impossible et pourrait engendrer des répercussions difficilement prévisibles et très négatives pour l'Homme. Il est important de continuer à lutter contre les maladies ayant un fort impact sur la santé humaine et animale mais plutôt que chercher à les éliminer systématiquement une nouvelle approche plus efficace et durable peut être delimiter les dommages liés à leur transmission.

Bibliographie :

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. https://doi.org/10.1007/s004360050628

Alizon, S.,2016. C'est grave Dr Darwin? L'évolution, les microbes et nous. Le Seuil(Ed)

Alzieu, J.-P., Dordchies, P., 2012. Réémergence de la paramphistomose bovine\n en France : Synthèse des connaissances actuelles épidémiologiques, physiopathologiques et\n diagnostiques. Bull. l'Académie vétérinaire de\n Fr. [ISSN 0001-4192], 2007, Vol. 160, N° 2, pp. 93-99 93–100.

Anderson, R.M., May, R.M., Joysey, K., Mollison, D., Conway, G.R., Cartwell, R., H.V., T., Dixon, B., 1986. The invasion, persistence and spread of infections diseases within animal and plant communities. Philos. Trans. R. Soc. B-Biological Sci. 314, 533–570.

Andlauer, W., Fürst, P., 2002. Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. Food Res. Int. 35, 171–176. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00179-X

Armour, J., 1989. The influence of host immunity on the epidemiology of Trichostrongyle infections in cattle. Vet. Parasitol. 32, 5-19.

Ashrafi, K., Saadat, F., O'Neill, S., Rahmati, B., Amin Tahmasbi, H., Pius Dalton, J., Nadim, A., Asadinezhad, M., Rezvani, S.M., 2015. The endemicity of human fascioliasis in Guilan province, northern Iran: The baseline for implementation of control strategies. Iran. J. Public Health 44, 501–511.

Baggenstos, R., Dahinden, T., Torgerson, P.R., Bär, H., Rapsch, C., Knubben-Schweizer, G., 2016. Validation of an interactive map assessing the potential spread of galba truncatula as intermediate host of Fasciola hepatica in Switzerland. Geospat. Health 11, 137–143. https://doi.org/10.4081/gh.2016.418

Baker, R.L., Gray, G.D., 2004. Appropriate breeds and breeding schemes for sheep and goats in the tropics, in: Sani, R., Gray, G.D., Baker, R.L. (Eds.), Better Worm

Control for Small Ruminants in Tropical Asia Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia. ACIAR Monograph N°113, pp. 63–95.

Baldock, F.C., Arthur, R.J., 1985. A survey of fascioliasis in beef cattle killed at abattoirs in southern Queensland. Aust. Vet. J. 62, 324–326. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1985.tb07650.x

Bayl, P., 2010. Le ragondin. in : Poitevin, F., Olivier, A., Bayle, P.,Scher, O. Mammifères de Camargue. Regard du Vivant et Parc naturel régional de Camargue(Ed).

Bazsalovicsová, E., Králová-hromadová, I., Jan, Š., Minárik, G., Bokorová, S., Pybus, M., 2015. Genetic interrelationships of North American populations of giant liver fluke Fascioloides magna. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0895-1

Beesley, N., Williams, D.J.L., Paterson, S., Hodgkinson, J., 2017. Fasciola hepatica demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. Int. J. Parasitol. 47, 11–20. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.007

Beesley, N.J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R.J., Hodgkinson, J.E., Martinez-Moreno, A., Martinez-Valladeres, M., Perez, J., Rinaldi, L., Williams, D.J.L., 2017. Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. Transbound. Emerg. Dis. https://doi.org/10.1111/tbed.12682

Bélanger, D., Leboeuf, A., Villeneuve, A., 2007. Gestion intégrée du parasitisme gastro-intestinal chez les moutons 26.

Bennema, S.C., Ducheyne, E., Vercruysse, J., Claerebout, E., Hendrickx, G., Charlier, J., 2011. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of Fasciola hepatica in dairy cattle in a temperate climate zone. Int. J. Parasitol. 41, 225–233. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.09.003

Blair, D., Davis, G.M., Wu, B., 2001. Evolutionary relationships between trematodes and snails emphasizing schistosomes and paragonimids. Parasitology 123. https://doi.org/10.1017/S003118200100837X

Blondel, J., Barruol, G., & Vianet, R. (Eds.). (2013). *L'Encyclopédie de la Camargue*. Buchet hastel(Ed).

Bohonak, A.J., Jenkins, D.G., 2003. Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. Ecol. Lett. 6, 783–796. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00486.x

Boitani, L., Mattei, L., Nonis, D., Corsi, F., 1994. Spatial and Activity Patterns of Wild Boars in Tuscany , Italy. J. Mammal. 75, 600–612. https://doi.org/10.2307/1382507

Boray, J.C., Happich, F.A., Andrews, J.C., 1969. The Epidemiology of Fasciolosis in two Representative Endemic Regions of Australia. Aust. Vet. J. 45, 549–553. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1969.tb16088.x

Boray J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. Adv. Parasitol., 7, 95-210.

Bouchut, A., Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Coustau, C., Mitta, G., 2008. The compatibility polymorphism in invertebrate host/trematodes interactions: Research of molecular determinants. Parasite 15, 304–309. https://doi.org/10.1051/parasite/2008153304

Bourke, M.G., Salwa, S., Harrington, K.J., Kucharczyk, M.J., Forde, P.F., de Kruijf, M., Soden, D., Tangney, M., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., 2011. The emerging role of viruses in the treatment of solid tumours. Cancer Treat. Rev. 37, 618–632. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.12.003

Breman, J., Arita, I., 1980. The confirmation and maintenance of smallpox eradication.

Budischak, S.A., Hoberg, E.P., Abrams, A., Jolles, A.E., Ezenwa, V.O., 2015. A combined parasitological molecular approach for noninvasive characterization of parasitic nematode communities in wild hosts. Mol. Ecol. Resour. 1112–1119. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12382

Bui, T.D., Doanh, P.N., Saegerman, C., Losson, B., 2015. Current status of fasciolosis in Vietnam: an update and perspectives. J. Helminthol. 1–12. https://doi.org/10.1017/S0022149X15000929

Burgarella, C., Gayral, P., Ballenghien, M., Bernard, A., David, P., Jarne, P., Correa, A., Hurtrez-Bousses, S., Escobar, J., Galtier, N., Glemin, S., 2015. Molecular evolution of freshwater snails with contrasting mating systems. Mol. Biol. Evol. 32, 2403–2416. https://doi.org/10.1093/molbev/msv121

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

Caron, A., Cross, P.C., Toit, J.T., Applications, S.E., Oct, N., 2012. Ecological Implications of Bovine Tuberculosis in African Buffalo Herds 13, 1338–1345.

Carter, J., Leonard, B.P., 2002. A Review of the Literature on the Worldwide Distribution, Spread of, and Efforts to Eradicate the Coypu (Myocastor coypus). Wildl. Soc. Bull. 30, 162–175. https://doi.org/10.2307/3784650

Castillo, L., Fernandez-Llario, P., Mateos, C., Carranza, J., Benitez-Medina, J.M., Garcia-Jimenez, W., Bermejo-Martin, F., Hermoso de Mendoza, J., 2011. Management practices and their association with Mycobacterium tuberculosis complex prevalence in red deer populations in Southwestern Spain. Prev. Vet. Med. 98, 58–63. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.11.008

Cawdery, M.J.H., 1984 Review of the economic importance of fascioliasis in sheep and cattle. Irish Vet News (September), 14–22.

Chapuis, E., Ferdy, J.B., 2012. Life history traits variation in heterogeneous environment: The case of a freshwater snail resistance to pond drying. Ecol Evol 2, 218–226. https://doi.org/10.1002/ece3.68

Charbonnel, N., Angers, B., Rasatavonjizay, R., Bremond, P., Debain, C., Jarne, P., 2002. The influence of mating system, demography, parasites and colonization on the population structure of Biomphalaria pfeifferi in Madagascar. Mol. Ecol. 11, 2213–2228. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01586.x

Charlier, J., Bennema, S.C., Caron, Y., Counotte, M., Ducheyne, E., Hendrickx, G., Vercruysse, J., 2011. Towards assessing fine-scale indicators for the spatial transmission risk of Fasciola hepatica in cattle. Geospat. Health 5, 239–245. https://doi.org/10.4081/gh.2011.176

Charlier, J., Soenen, K., De Roeck, E., Hantson, W., Ducheyne, E., Van Coillie, F., De Wulf, R., Hendrickx, G., Vercruysse, J., 2014a. Longitudinal study on the temporal and micro-spatial distribution of Galba truncatula in four farms in Belgium as a base for small-scale risk mapping of Fasciola hepatica. Parasit. Vectors 7, 528. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0528-0

Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., Vercruysse, J., 2014b. Chasing

helminths and their economic impact on farmed ruminants. Trends Parasitol. 30, 361–367. https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.009

Charlier, J., Vercruysse, J., Morgan, E., Van Dijk, J., Williams, D.J.L., 2014. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of Fasciola hepatica in cattle. Parasitology 141, 326–335. https://doi.org/10.1017/S0031182013001662

Chauvin, A., Zhang, W.Y., Moreau, E., 2007. La fasciolose des ruminants : immunité, immunomodulation et stratégie de prévention. Bull. Acad. Vet. Fr. 160, 85–92.

Chen, J.X., Chen, M.X., Ai, L., Xu, X.N., Jiao, J.M., Zhu, T.J., Su, H.Y., Zang, W., Luo, J.J., Guo, Y.H., Lv, S., Zhou, X.N., 2013. An Outbreak of Human Fascioliasis gigantica in Southwest China. PLoS One 8, e71520. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071520

Chlyeh, G., Dodet, M., Delay, B., Khallaayoune, K., Jarne, P., 2006. Spatio-temporal distribution of freshwater snail species in relation to migration and environmental factors in an irrigated area from Morocco. Hydrobiologia 553, 129–142. https://doi.org/10.1007/s10750-005-0968-9

Cleaveland, S., Laurenson, M.K., Taylor, L.H., 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: Pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 356, 991–999. https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0889

Coelli, T., Rao, D.S.., O'Donnell, C., Battese, G.., 2005. An Introduction to Efficiency and Productivity Analysis ▶ This is the only book that provides a comprehensive and unified introduction to the main techniques used in this field : index number methods , data envelopment analysis (DEA) and econometric tec 49, 6221.

Combes, C., Claude., Laurent G., Moulia C., Sicard M.,2018. Ecologie et évolution des interactions durables. Dunod (Ed).

Costa, 2005. Atlas Des Especes Invasives Presentes.

Cotruvo, J.A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D.O., Craun, G.F., Fayer, R., Gannon, V.P.J. (Eds.), 2004. Waterborne Zoonoses: Identification,

Causes, and Control. IWA publishing.

Cowie, R.H., Robinson, D.G., 2003. Pathways of Introductions of Nonindigenous Land and Freshwater Snails and Slugs. Invasive species vectors Manag. Strateg. 93–122. https://doi.org/10.13140/2.1.4546.9126

Cox, F.E., 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. Parasitology 122 Suppl, S23--S38. https://doi.org/10.1017/S003118200001698X

Criscione, C.D., Poulin, R., Blouin, M.S., 2005. Molecular ecology of parasites: Elucidating ecological and microevolutionary processes. Mol. Ecol. 14, 2247–2257. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02587.x

Cuervo, P.F., Cataldo, S. Di, Fantozzi, M.C., Deis, E., Isenrath, G.D., Viberti, G., Artigas, P., Peixoto, R., Valero, M.A., Sierra, R.M.Y., Mas-Coma, S., 2015. Liver fluke (Fasciola hepatica) naturally infecting introduced European brown hare (Lepus europaeus) in northern Patagonia: phenotype, prevalence and potential risk. Acta Parasitol. 60, 536–543. https://doi.org/10.1515/ap-2015-0076

Cwiklinski, K., Allen, K., LaCourse, J., Williams, D.J., Paterson, S., Hodgkinson, J.E., 2015. Characterisation of a novel panel of polymorphic microsatellite loci for the liver fluke, Fasciola hepatica, using a next generation sequencing approach. Infect. Genet. Evol. 32, 298–304. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.014

De Garine-Wichatitsky, M., Caron, A., Kock, R., Tschopp, R., Munyeme, M., Hofmeyr, M., Michel, A., 2013. A review of bovine tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in sub-Saharan Africa. Epidemiol. Infect. 141, 1342–1356. https://doi.org/10.1017/S0950268813000708

de Meeûs, T., McCoy, K.D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S., Renaud, F., 2007. Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête." Infect. Genet. Evol. 7, 308–332. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.07.003

Dillon, R.T.J., 2004. The ecology of freshwater molluscs, Cambridge. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Dobson, A., Lafferty, K.D., Kuris, A.M., Hechinger, R.F., Jetz, W., 2008. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? Proc. Natl. Acad. Sci. 105,

11482–11489. https://doi.org/10.1073/pnas.0803232105

Doyle, J.-J. 1972. Evidence of an acquired resistance in calves to a single experimental infection with Fasciola hepatica. Res Vet Sci. 13: 456-459

Dreyfuss, G., Vignoles, P., Ondelaud, D., 2014. Fasciola hepatica and Paramphistomum daubneyi: decrease in prevalence of natural infection in habitats colonized by Galba truncatula and Lymnaea glabra. Rev. Med. Vet. (Toulouse). 165, 160–166.

Dreyfuss, G., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2005. Fasciola hepatica: Epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. Parasitol. Res. 95, 278–282. https://doi.org/10.1007/s00436-004-1269-3

Duclos, J.C .,2013. L'élevage ovin. In : Blondel, J., Barruol, G., & Vianet, R. *L'Encyclopédie de la Camargue*. Buchet hastel(Ed).

Dunn, R.R., Harris, N.C., Colwell, R.K., Koh, L.P., Sodhi, N.S., 2009. The sixth mass coextinction: Are most endangered species parasites and mutualists? Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 276, 3037–3045. https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0413

Durbin, C.G., 1952. Longevity of the liver fluke, Fasciola sp. in sheep. In: Otto, G.F. (Ed.), proceedings of the Helminthological Society of Washington. The Helminthological Society of Washington, 120.

Duwel, D., Reisenleiter, R., 1990. *Fasciola hepatica* : coprological diagnosis in comparison to the worm burden in sheep and cattle. Angew Parasitol. 31: 211 217.

Engel, C.R., 2002. Acknowledging the Potential Role of Animal Self-Medication. UK Org. Res. 2002 Conf. 355–358.

Ezenwa, V.O., Jolles, A.E., 2015. Epidemiology. Opposite effects of anthelmintic treatment on microbial infection at individual versus population scales. Science 347, 175–7. https://doi.org/10.1126/science.1261714

Fabre.P., 2013. Le pastoralisme d'hier et aujourd'hui. In : Blondel, J., Barruol, G., &

Facon, B., Pointier, J.P., Glaubrecht, M., Poux, C., Jarne, P., David, P., 2003. A molecular phylogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic Thiarid snails. Mol. Ecol. 12, 3027–3039. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01972.x

Fairweather, I., 2011. Reducing the future threat from (liver) fluke: Realistic prospect or quixotic fantasy? Vet. Parasitol. 180, 133–143.

https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.034

Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M.J., Graham, D.Y., Vacher, S., Perez-Perez, G.I., Yamaoka, Y., Mégraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M., Suerbaum, S., 2003. Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations. Science (80-.). 299, 1582–1585. https://doi.org/10.1126/science.1080857

FAO, 2007. Animal genetic resources and resistance to disease, in: Rischkowsky B., Pilling, D. (Eds.), The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. pp. 101–112.

Fentie, T., Erqou, S., Gedefaw, M., Desta, A., 2013. Epidemiology of human fascioliasis and intestinal parasitosis among schoolchildren in lake Tana Basin, northwest Ethiopia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 107, 480–486. https://doi.org/10.1093/trstmh/trt056

Fritz, H., Loison, A., 2006. Large herbivores across biomes, Large Herbivore Ecology, Ecosystem Dynamics and Conservation. https://doi.org/10.1017/CBO9780511617461.003

Fürst, T., Duthaler, U., Sripa, B., Utzinger, J., Keiser, J., 2012. Trematode Infections. Infect. Dis. Clin. North Am. 26, 399–419. https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.008

Gaasenbeek, C.P., Over, H.J., Noorman, N., de Leeuw, W.A., 1992. An epidemiological study of Fasciola hepatica in The Netherlands. Vet. Q. 14, 140–144. https://doi.org/10.1080/01652176.1992.9694351

Gallup, J., Sachs, J., 2001. The economic burden of malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 64, 85–96. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.85

Ganz, H.H., Ebert, D., 2011. Depend on Parasite Diversity 91, 1263–1268.

García-Martínez, A., Olaizola, A., Bernués, A., 2009. Trajectories of evolution and drivers of change in European mountain cattle farming systems. Animal 3, 152–165. https://doi.org/10.1017/S1751731108003297

Garrett, K.A., Mundt, C.C., 1999. Epidemiology in Mixed Host Populations. Phytopathology 89, 984–990. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.11.984

Gazzinelli, A., Correa-Oliveira, R., Yang, G.-J., Boatin, B.A., Kloos, H., 2012. A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: Social Ecology, Environmental Determinants, and Health Systems. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1603. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001603

Ghebreyesus, T.A., Witten, K.H., Getachew, A., Haile, M., Yohannes, M., Lindsay, S.W., Byass, P., 2002. Schistosome transmission, water-resource development and altitude in northern Ethiopia. Ann. Trop. Med. Parasitol. 96, 489–495. https://doi.org/10.1179/000349802125001285

Gilleard, J.S., Beech, R.N., 2007. Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes. Parasitology 134, 1133–1147. https://doi.org/10.1017/S0031182007000066

Gómez, A., Nichols, E.S., Perkins, S.L., 2011. PARASITE CONSERVATION, CONSERVATION MEDICINE, AND ECOSYSTEM HEALTH Andrés Gómez , Elizabeth S. Nichols, and Susan L. Perkins 67–81.

Gompper, M.E., Williams, E.S., 1998. Parasite Conservation and the Black-Footed Ferret Recovery Program. Conserv. Biol. 12, 730–732. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.97196.x

Goumghar, M. D., P. Vignoles, D. Rondelaud, G. Dreyfuss, and M. Benlemlih. 2001. Relations entre les générations annuelles de Lymnaea truncatula (Mollusca Gastropoda: Lymnaeidae), l'altitude et la nature de ses habitats dans le centre du Maroc. Revue Médicale Vétérinaire 152:457–462

Griffith, G.W., 2012. Do we need a global strategy for microbial conservation? Trends Ecol. Evol. 27, 1–2. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.10.002

Grillo, V., Jackson, F., Cabaret, J., Gilleard, J.S., 2007. Population genetic analysis of the ovine parasitic nematode Teladorsagia circumcincta and evidence for a cryptic species. Int. J. Parasitol. 37, 435–447. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.014

Grimes, J.E.T., Croll, D., Harrison, W.E., Utzinger, J., Freeman, M.C., Templeton, M.R., J.E., G., D., C., W.E., H., J., U., M.C., F., M.R., T., 2015. The roles of water, sanitation and hygiene in reducing schistosomiasis: A review. Parasites and Vectors 8, 156. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0766-9

Guégan, J. F., & Choisy, M. (2008). Introduction à l'épidémiologie intégrative. De Boeck Supérieur.

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. Parasitol. Res. 88, 535–539. https://doi.org/10.1007/s00436-002-0625-4

Gutierrez, A., Yong, M., Wong, L., Sánchez, J., 2001. The combined effect of isolation and Fasciola hepatica infection on the life history traits of Fossaria cubensis. J. Invertebr. Pathol. 78, 66–71. https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5044

Halberstein, R.A., 2005. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. Ann. Epidemiol. 15, 686–699. https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.02.004

Haroun, E.T.M., Hillyer, G. V., 1986. Resistance to fascioliasis - A review. Vet. Parasitol. 20, 63–93. https://doi.org/10.1016/0304-4017(86)90093-2

Harris, N.C., Coonan, T.J., King, J.L., Dunn, R.R., 2013. Endemism in host-parasite interactions among island populations of an endangered species. Divers. Distrib. 19, 377–385. https://doi.org/10.1111/ddi.12016

Hart, B.L., 2005. The evolution of herbal medicine: Behavioural perspectives. Anim. Behav. 70, 975–989. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.03.005

Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2008. Wolbachia and virus protection in insects. Science (80-.). 322, 702. https://doi.org/10.1126/science.1162418

Heitz, F., Delbeque, V., 2007. Soignez vos animaux par les plantes, Quintessen. ed.

Hosseini, P.R., Mills, J.N., Prieur-Richard, A.H., Ezenwa, V.O., Bailly, X., Rizzoli, A., Suzán, G., Vittecoq, M., García-Penã, G.E., Daszak, P., Guégan, J.F., Roche, B., 2017. Does the impact of biodiversity differ between emerging and endemic pathogens? The need to separate the concepts of hazard and risk. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 372. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0129

Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends Parasitol. 22, 253–261. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.004

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. Vet. Parasitol. 180, 144–154. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.035

Hotez, P.J., Bottazzi, M.E., Franco-Paredes, C., Ault, S.K., Periago, M.R., 2008. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. PLoS Negl. Trop. Dis. 2. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300

Houin, P.R., 2009. La fasciolose, une zoonose réémergente? Bull. Acad. Vet. Fr. 162, 161–164.

Howell, A., Baylis, M., Smith, R., Pinchbeck, G., Williams, D., 2015. Epidemiology and impact of Fasciola hepatica exposure in high-yielding dairy herds. Prev. Vet. Med. 121, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.05.013

Hurtrez-Boussès, S., Hurtrez, J.E., Turpin, H., Durand, C., Durand, P., De Meeüs, T., Meunier, C., Renaud, F., 2010. Hydrographic network structure and population genetic differentiation in a vector of fasciolosis, Galba truncatula. Infect. Genet. Evol. 10, 178–183. https://doi.org/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.

Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol. Biol. Evol. 23, 254–267. https://doi.org/10.1093/molbev/msj030

Huson, K.M., Oliver, N.A.M., Robinson, M.W., 2017. Paramphistomosis of Ruminants: An Emerging Parasitic Disease in Europe. Trends Parasitol. 33, 836–844. https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.07.002

Huyse, T., Webster, B.L., Geldof, S., Stothard, J.R., Diaw, O.T., Polman, K., Rollinson, D., 2009. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. PLoS Pathog. 5. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000571

Ijumba, J.N., Lindsay, S.W., 2001. Impact of irrigation on malaria in Africa: Paddies paradox. Med. Vet. Entomol. 15, 1–11. https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00279.x

INVS. 2003. Épidémie de distomatose à Fasciola hepatica dans la région Nord-Pas de Calais. http:www.invs.sante.fr/recherche/ index2.asp?txtQuery=distomatose&Submit.x=0Submit.y=10

Jacqueline, C., Tasiemski, A., Sorci, G., Ujvari, B., Maachi, F., Missé, D., Renaud, F., Ewald, P., Thomas, F., Roche, B., 2017. Infections and cancer: The "fifty shades of immunity" hypothesis. BMC Cancer 17, 1–11. https://doi.org/10.1186/s12885-017-3234-4

Jarne, P., 1995. Mating system, bottlenecks and genetic-polymorphism In hermaphroditic animals. Genet. Res. 65, 193–207. https://doi.org/doi:10.1017/S0016672300033279

Johnson, P.T.J., Chase, J.M., 2004. Parasites in the food web: Linking amphibian malformations and aquatic eutrophication. Ecol. Lett. 7, 521–526. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00610.x

Jones H.1990. Population geography. Paul Chapman Publishing Ltd, London. 321 pp

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. Nature 451, 990–994. https://doi.org/10.1038/nature06536

Kamath, P.L., Turner, W.C., Küsters, M., Getz, W.M., 2014. Parasite-mediated selection drives an immunogenetic trade-off in plains zebras (Equus quagga). Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 281. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0077

Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report. Trends Parasitol. 20, 477–481. https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001

Kawata, M., Sawada, H., Yokoyama, J., 2005. The effects of spatial habitat structure on the evolution of density-dependent growth and reproduction in freshwater snails. Hyd 553, 229–241.

Keiser, J., Utzinger, J., 2009. Food-borne trematodiases. Clin. Microbiol. Rev. 22, 466–483. https://doi.org/10.1128/CMR.00012-09

Kelley, J.M., Elliott, T.P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., Spithill, T.W., 2016. Current Threat of Triclabendazole Resistance in Fasciola hepatica. Trends Parasitol. 32, 458–469. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.002

Keyyu, J.D., Monrad, J., Kyvsgaard, N.C., Kassuku, A.A., 2005. Epidemiology of Fasciola gigantica and amphistomes in cattle on traditional, small-scale dairy and large-scale dairy farms in the southern highlands of Tanzania. Trop. Anim. Health Prod. 37, 303–314. https://doi.org/10.1007/s11250-005-5688-7

Khan, M.K., Sajid, M.S., Riaz, H., Ahmad, N.E., He, L., Shahzad, M., Hussain, A., Khan, M.N., 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. Parasitol. Res. 112, 2421–2430. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3464-6

Killingley, J., 1980. Migrations of California Gray Whales Tracked by Oxygen-18 Variations in their Epizoic Barnacles Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : http://www.jstor.org/stable/1683675 Migrations of California Gray Whales Tracke 207, 759–760.

Kruse, H., Kirkemo, A.M., Handeland, K., 2004. Wildlife as source of zoonotic infections. Emerg. Infect. Dis. 10, 2067–2072. https://doi.org/10.3201/eid1012.040707

Kuchai, J., 2011. Impact of Season, Sex, Age, and Agro-Ecology on the Prevalence of Fascioliasis in Buffalos of Ladakh. Online J. Anim. Feed Res. 1, 263.

Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Kuris, A.M., 2006. Parasites dominate food web links. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 11211–11216. https://doi.org/10.1073/pnas.0604755103

Lebarbenchon, C., Brown, S.P., Poulin, R., Gauthier-Clerc, M., Thomas, F., 2008. Evolution of pathogens in a man-made world. Mol. Ecol. 17, 475–484. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03375.x

Lockyer, A.E., Jones, C.S., Noble, L.R., Rollinson, D., 2004. Trematodes and snails: an intimate association. Can. J. Zool. 82, 251–269. https://doi.org/10.1139/z03-215

Lodge, D.M., Stein, R. a, Brown, K.M., Covich, A.P., Bronmark, C., Garvey, J.E., Klosiewski, S.P., 1998. Predicting impact of freshwater exotic species on native biodiversity: challenges in spatial scaling. Aust. J. Ecol. 23, 53–67. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1998.tb00705.x

Loo, S.E., Keller, R.P., Leung, B., 2007. Freshwater invasions: Using historical data to analyse spread. Divers. Distrib. 13, 23–32. https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2006.00313.x

Lounnas, M., Correa, A.., Vázquez, A.., Dia, A., Escobar, J.., Nicot, A., Arenas, J., Ayaqui, R., Dubois, M.., Gimenez, T., Gutiérrez, A., González-Ramírez, C., Noya, O., Prepelitchi, L., Uribe, N., Wisnivesky-Colli, C., Yong, M., David, P., Loker, E.., Jarne, P., Pointier, J.., Hurtrez-Boussès, S., 2017. Self-fertilization, long-distance flash invasion and biogeography shape the population structure of Pseudosuccinea columella at the worldwide scale. Mol. Ecol. 12, 3218–3221. https://doi.org/10.1111/ijlh.12426

Lumaret, J., Errouissi, F., 2002. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. Vet Res 547–562. https://doi.org/10.1051/vetres

Mackenzie, K., Williams, H.H., Williams, B., Mcvicar, A.H., Siddall, R., 1995. Parasites as Indicators of Water Quality and the Potential Use of Helminth Transmission in Marine Pollution Studies, Advances in Parasitology. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60070-6

Mage, C., Bourgne, H., Toulieu, H., 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 439–447. https://doi.org/10.1051/vetres

Mailhan, J., Colombaud, S., 2013. L'élevage bovin. In : Blondel, J., Barruol, G., & Vianet, R. *L'Encyclopédie de la Camargue*. Buchet hastel(Ed).

Maqbool, A., Hayat, C.S., Akhtar, T., Hashmi, H.A., 2002. Epidemiology of fasciolosis in buffaloes under different managemental conditions. Vet. Arh. 72, 221–228.

Marchand, P., Freycon, P., Herbaux, J.P., Game, Y., Toïgo, C., Gilot-Fromont, E., Rossi, S., Hars, J., 2017. Sociospatial structure explains marked variation in brucellosis seroprevalence in an Alpine ibex population. Sci. Rep. 7, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15803-w

Marcogliese, D.J., 2005. Parasites of the superorganism: Are they indicators of ecosystem health? Int. J. Parasitol. 35, 705–716.

https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.01.015

Marcogliese, D.J., 2004. Parasites: Small Players with Crucial Roles in the Ecological Theater. Ecohealth 1, 151–164. https://doi.org/10.1007/s10393-004-0028-3

Martins, I.V.F., Avelar, B.R. De, Bernardo, C.D.C., Leão, A.C. De, Salim, M.J., 2014. of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update. Brazilian J. Vet. Parasitol. 23, 23–9.

Mas-Coma, S., 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. J. Helminthol. 79, 207–216. https://doi.org/10.1079/JOH2005296

Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009. Chapter 2 Fasciola, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control 69, 41–146. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(09)69002-3

Mazé-Guilmo, E., Blanchet, S., Mccoy, K.D., Loot, G., 2016. Host dispersal as the driver of parasite genetic structure: A paradigm lost? Ecol. Lett. 19, 336–347. https://doi.org/10.1111/ele.12564

McArthur, R.H ., Wilson, E.O., 1967. The Theory of Island Biogeography. Princeton University Press (Ed), Princeton, New Jersey.

Mekky, M.A., Tolba, M., Abdel-Malek, M.O., Abbas, W.A., Zidan, M., 2015. Human fascioliasis: A re-emerging disease in Upper Egypt. Am. J. Trop. Med. Hyg. 93, 76–79. https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0030

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. Vet. Res. 32, 499–508. https://doi.org/10.1051/vetres:2001141

Ménard, A., L'Hostis, M., Leray, G., Marchandeau, 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. https://doi.org/10.1051/parasite/2000072077

Meunier, C., Hurtrez-Boussès, S., Jabbour-Zahab, R., Durand, P., Rondelaud, D., Renaud, F., 2004. Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc Lymnaea truncatula (Gastropoda, Pulmonata). Heredity

(Edinb). 92, 316–322. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800410

Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., Pointier, P., Jourdane, J., Renaud, F., 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. Mol. Ecol. 10, 1333–1340. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01284.x

Mezo, M., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Manga-González, M.Y., Peixoto, R., Mas-Coma, S., Valero, M.A., 2013. The wild boar (Sus scrofa Linnaeus, 1758) as secondary reservoir of Fasciola hepatica in Galicia (NW Spain). Vet. Parasitol. 198, 274–283. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.009

Michel, A.L., Bengis, R.G., 2012. The African buffalo: A villain for inter-species spread of infectious diseases in southern Africa. Onderstepoort J Vet Res 79. https://doi.org/10.4102/ojvr.v79i2.453

Miguel, E., Grosbois, V., Caron, A., Boulinier, T., Fritz, H., Cornelis, D., Foggin, C., Makaya, P. V., Tshabalala, P.T., De Garine-Wichatitsky, M., 2013. Contacts and foot and mouth disease transmission from wild to domestic bovines in Africa. Ecosphere 4, 1–32. https://doi.org/10.1890/ES12-00239.1

Mintsa Nguema, R., Langand, J., Galinier, R., Idris, M.A., Shaban, M.A., Al Yafae, S., Moné, H., Mouahid, G., 2013. Genetic diversity, fixation and differentiation of the freshwater snail Biomphalaria pfeifferi (Gastropoda, Planorbidae) in arid lands. Genetica 141, 171–184. https://doi.org/10.1007/s10709-013-9715-8

Moens, R., 1991 .Factors affecting Lymnaea truncatula populations and related control measures. Journal of Medical and Applied Malacology, 3, 73–84.

Moens, R., 1982. — Observations au sujet de la prédation de Zonitoides nitidus Millier sur lymnaea truncatula Millier. Bull. Ecol., 13: 273-282.

Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J.S., Truman, R.W., Williams, D.L., Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J., 2008. On the origin of leprosy . To cite this version : HAL Id : pasteur-00204117.

Morozova, E. V., Chrisanfova, G.G., Arkhipov, I.A., Semyenova, S.K., 2004. Polymorphism of the ND1 and CO1 mitochondrial genes in populations of liver fluke Fasciola hepatica. Russ. J. Genet. 40, 817–820.

https://doi.org/10.1023/B:RUGE.0000036534.01952.19

Morse, S.S., 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg. Infect. Dis. 1, 7–15. https://doi.org/10.3201/eid0101.950102

Moule, L., 2009. Contrôle intégré du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants au pâturage en zone tropicale humide Integrated control of gastrointestinal parasitism in grazing small ruminants in the humid tropics 265–268.

Moutou, F., Morand,S., Richomme, C.,2014. *Faune sauvage, biodiversité et santé, quels défis?* In : Quae(Ed).

Mumcuoglu, K.Y., 1996. Control of human lice (Anoplura: Pediculidae) infestations: Past and present. Am. Entomol. 42, 175–178. https://doi.org/10.1093/ae/42.3.175

Nadler, S.A., 1995. Microevolution and the Genetic Structure of Parasite Populations. J. Parasitol. 81, 395. https://doi.org/10.2307/3283821

Nansen, P., Andersen, S., Harmer, E., & Riising, H. J. (1972). Experimental fascioliasis in the pig. Experimental parasitology, 31, 247-254.

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). Mol. Ecol. Resour. 8, 1281–1284. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02065.x

Nieberding, C.M., Olivieri, I., 2007. Parasites: proxies for host genealogy and ecology? Trends Ecol. Evol. 22, 156–165. https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.012

Novobilský, A., Engström, A., Sollenberg, S., Gustafsson, K., Morrison, D. a., Höglund, J., 2014. Transmission patterns of Fasciola hepatica to ruminants in sweden. Vet. Parasitol. 203, 276–286. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.015

Nyindo, M., Lukambagire, A.H., 2015. Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. Biomed Res. Int. 2015, 8. https://doi.org/10.1155/2015/786195

Nzalawahe, J., Kassuku, A.A., Stothard, J.R., Coles, G.C., Eisler, M.C., 2015. Associations between trematode infections in cattle and freshwater snails in

Observatoire des Zones Humides Méditerranéennes., 2014. Occupation du sol dynamiques spatiales de 1975 à 2005 dans les zones humides littorales

méditerranéennes. Dossier thématique N°2. Tour du Valat, France. 48: ISBN : 2-910368-59-9

highland and lowland areas of Iringa Rural District, Tanzania. Parasitology 1–10. https://doi.org/10.1017/S0031182015000827

O'Hea, N.M., Kirwan, L., Giller, P.S., Finn, J.A., 2010. Lethal and sub-lethal effects of ivermectin on north temperate dung beetles, Aphodius ater and Aphodius rufipes (Coleoptera: Scarabaeidae). Insect Conserv. Divers. 3, 24–33. https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2009.00068.x

OIE, 2011. Code sanitaire de l'OIE pour les animaux terrestres 1–10.

Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., Bach, J.F., 2010. The "hygiene hypothesis" for autoimmune and allergic diseases: An update. Clin. Exp. Immunol. 160, 1–9. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x

Ollerenshaw, C.B., 1966. The approach to forecasting the incidence of fascioliasis over England and Wales 1958–1962. Agric. Meteorol. 3, 35–53. https://doi.org/10.1016/0002-1571(66)90004-5

Olivier, A., Mondain-Monval, J.Y., Massez, G., 2010. Le lapin de garenne. in : Poitevin, F., Olivier, A., Bayle, P.,Scher, O. - Mammifères de Camargue. Regard du Vivant et Parc naturel régional de Camargue(Ed)

Olivier, A., Mondain-Monval, J.Y., 2010. Le lièvre européen. in : Poitevin, F., Olivier, A., Bayle, P., Scher, O. - Mammifères de Camargue. Regard du Vivant et Parc naturel régional de Camargue(Ed)

Olivier, A., Mondain-Monval, J.Y., 2010.Le sanglier. in : Poitevin, F., Olivier, A., Bayle., Scher, O. - Mammifères de Camargue. Regard du Vivant et Parc naturel régional de Camargue(Ed)

Olsen, A., Frankena, K., Bødker, R., Toft, N., Thamsborg, S.M., Enemark, H.L., Halasa, T., 2015. Prevalence, risk factors and spatial analysis of liver fluke infections in Danish cattle herds. Parasit. Vectors 8, 160. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0773-x

OMS 2018http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water

OMS, 2012. Rapport Oms 2012 Sur La Résistance Du Vih Aux Antirétroviraux. Program. VIH/SIDA PMS 178. https://doi.org/ISBN 978 92 4 250393 7

OMS, 2000. Résistance aux antimicrobiens : une menace pour le monde 29.

Otranto, D., Traversa, D., 2003. Dicrocoeliosis of ruminants: A little known fluke disease. Trends Parasitol. 19, 12–15. https://doi.org/10.1016/S1471-

4922(02)00009-0

Palm, H.W., Rückert, S., 2009. A new approach to visualize ecosystem health by using parasites. Parasitol. Res. 105, 539–553. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1423-z

Palmer, D.G., Lyon, J., Palmer, M. a, Forshaw, D., 2014. Evaluation of a copro-antigen ELISA to detect Fasciola hepatica infection in sheep, cattle and horses. Aust. Vet. J. 92, 357–61. https://doi.org/10.1111/avj.12224

Pascual, S., Abollo, E., 2005. Whaleworms as a tag to map zones of heavy-metal pollution. Trends Parasitol. 21, 204–206. https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.03.005

Petney, T.N., Taraschewski, H., 2010. Waterborne Parasitic Diseases: Hydrology, Regional Development, and Control. Treatise Water Sci. 3,

Perera, G. 1996. Ecologie des mollusques d'eau douce d'intérêt médical et vétérinaire à Cuba. PhD Thesis, University of Perpignan.

303–366. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53199-5.00061-0

Phiri, A.M., Phiri, I.K., Sikasunge, C.S., Monrad, J., 2005. Prevalence of fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with emphasis on age, sex and origin. J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal. 52, 414–416. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00872.x

Plan bleu, 2012. les demandes en eau toujours satisfaites en méditerranée à l'horizon 2050 ? les notes du plan bleu 25, 4–7.

Pleasance, J., Wiedosari, E., Raadsma, H.W., Meeusen, E., Piedrafita, D., 2011. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. Parasite Immunol. 33, 495–505. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01305.x

PNR Camargue, 2011. Pour une gestion du risque parasitaire interne chez les bovins de Camargue. Cahier Technique n°8.

Pointier, J.P., Augustin, D., 1999. Biological control and invading frehwatwr snail. A case study. Life Sci. 322, 1093–1098.

Pointier, J.P., Coustau, C., Rondelaud, D., Theron, A., 2007. Pseudosuccinea columella (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of Fasciola hepatica: First record for France in the wild. Parasitol. Res. 101, 1389–1392. https://doi.org/10.1007/s00436-007-0656-y

Pointier, J.P., 2015. Freshwater molluscs of Venezuela and their medical and veterinary importance. In: Conchbook, Hackenheim(Ed), ISBN 978-3-939767-61-9, 228p.

Pointier, J.P., Jourdane, J., 2000. Biological control of the intermediate snail hosts of schistosomiasis in the Caribbean area. Quart. Cong. Cub. Microbiol. Parasit. 77, 53–60.

Pointier, J.P., Pointier, J.P., David, P., Jarne, P., 2005. Biological invasions: the case of planorbid snails. J. Helminthol. 79, 249–256. https://doi.org/10.1079/JOH2005292

Poitevin, F., Olivier, A., Bayle, P., Scher, O. 2010 – Mammifères de Camargue. Regard du Vivant et Parc naturel régional de Camargue(Ed). 233

Poulin, R., Morand, S., 2000. The Diversity of Parasites. Q. Rev. Biol. 75, 277–293. https://doi.org/10.1086/393500

Preston, D.L., Orlofske, S.A., Lambden, J.P., Johnson, P.T.J., 2013. Biomass and productivity of trematode parasites in pond ecosystems. J. Anim. Ecol. 82, 509–517. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12030

Price, P. W., 1980. Evolutionary biology of parasites (Vol. 15). Princeton University Press(Ed).

Pulido-Murillo, E.A., Furtado, L.F. V., Melo, A.L., Rabelo, É.M.L., Pinto, H.A., 2018. Fishborne zoonotic trematodes transmitted by Melanoides tuberculata snails, Peru. Emerg. Infect. Dis. 24, 606–608. https://doi.org/10.3201/eid2403.172056

Ravat, F., Jault, P., Gabard, J., 2015. Bactériophages et phagothérapie : Utilisation de Virus Naturels pour traiter les infections bactériennes. Ann. Burns Fire Disasters 28, 13–20.

Ravinet, N. (2014). Développement de stratégies de maîtrise des strongyloses gastro-intestinales des vaches laitières rationalisant les traitements anthelminthiques (Phd thesis, l'École Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique)

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. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.003

Rifkinson-Mann, S., Pait, T.G., Stone, J.L., 1988. Cranial surgery in ancient Peru. Neurosurgery. https://doi.org/10.1227/00006123-198810000-00001

Rim, H.J., Farag, H.F., Sornmani, S., Cross, J.H., 1994. Food-borne trematodes: Ignored or emerging? Parasitol. Today 10, 207–209. https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90111-2

Roberts, E.W., 1950. Studies on the life-cycle of fasciola hepatica (linnaeus) and of its snail host, limnaea (galba) truncatula (müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. Ann. Trop. Med. Parasitol. 44, 187–206. https://doi.org/10.1080/00034983.1950.11685441

Roberts, J.A., Estuningsih, E., Wiedosari, E., Spithill, T.W., 1997. Acquisition of resistance against Fasciola gigantica by Indonesian thin tail sheep. Vet. Parasitol. 73, 215–224. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00119-2

Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R., 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. Phytochemistry 69, 299–322. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.08.017

Rojas, L., Vazquez, A., Domenech, I., Robertson, L.J., 2010. Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? Trends Parasitol. 26, 26–34. https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.10.005

Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M., 2012. Update on trematode infections in sheep. Vet. Parasitol. 189, 15–38. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.029

Rondelaud, D., 1983. les réseaux de drainage superficiel et leur colonisation par lymnea truncatula Müller. A propos de quatre années d'observation en Haute-Vienne, France.

Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Vignoles, P., 2009a. La limnée tronquée : - Un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire, Première édition. ed. Presses universitaires de Limoges.

Rondelaud, D., Hourdin, P., Dreyfuss, P.V.G., 2009b. Peut- on détecter les habitats d ' un mollusque : Galba truncatula (Gastéropodes , Lymnaeidae) à l ' aide de plantes indicatrices sur les sols acides du Limousin ? 1–12.

Rondelaud, D., Hourdin, P., Vignoles, P., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 2011. Veterinary Parasitology The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. Vet. Parasitol. 181, 166–173. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.056

Rondelaud, D., Vignoles, P., Abrous, M., Dreyfuss, G., 2001. The definitive and intermediate hosts of Fasciola hepatica in the natural watercress beds in central France. Parasitol. Res. 87, 475–478. https://doi.org/10.1007/s004360100385

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. Biol. Control 39, 290–299. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.07.015

Rook, G.A.W., 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. Immunology 126, 3–11. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03007.x

Ross, J.G., Dow, C., Todd, J.R., 1967. The Pathology of Fasciola Hepatica Infection in Pigs: a Comparison of the Infection in Pigs and other Hosts. Br. Vet. J. 123, 317–322. https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)39909-8

Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., Panadero, R., Pedreira, J., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2002. Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). Vet. Res. Commun. 26, 361–370. https://doi.org/10.1023/A:1016290727793

Sasal, P., Mouillot, D., Fichez, R., Chifflet, S., Kulbicki, M., 2007. The use of fish parasites as biological indicators of anthropogenic influences in coral-reef lagoons: A case study of Apogonidae parasites in New-Caledonia. Mar. Pollut. Bull. 54, 1697–1706. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.06.014

Schallig, H.D.F.H., Sassen, M.J.M., Hordijk, P.L., Jong-Brink, D., 1991. Trichobilharzia oelata: influence of infection on the fecundity of its intermediate host Lymnaea stagnalis and cercaria undiuction on the release of schistosomin, a

snail neuropeptid antagonizing female gonodotropic hormones. Parasitology 102, 85–91.

Semyenova, S.K., Morozova, E. V, Chrisanfova, G.G., Vladimir, V., Arkhipov, I.A., Moskvin, A.S., Movsessyan, S.O., Ryskov, A.P., Semyenova, S.K., Morozova, E. V, Chrisanfova, G.G., Gorokhov, V. V, Arkhipov, I.A., Moskvin, A.S., Movsessyan, S.O., Ryskov, A.P., 2006. Genetic differentiation in eastern european and westerasian population of the liver fluke,Fasciola hepatica, as revealed by mitochondrial NAD1 andd COX1 genes. J. Parasitol. 92, 525–530.

Shaw, D.J., Vercruysse, J., Claerebout, E., Dorny, P., 1998. Gastrointestinal nematode infections of first-grazing season calves in Western Europe general patterns and the effect of chemoprophylaxis. Vet. Parasitol. 75, 115-131

Shurkin, J., 2014. News Feature: Animals that self-medicate: Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 17339–17341. https://doi.org/10.1073/pnas.1419966111

Simpson, A.G.B., Roger, A.J., Silberman, J.D., Leipe, D.D., Edgcomb, V.P., Jermiin, L.S., Patterson, D.J., Sogin, M.L., Kofoid, C.A., Christiansen, E.B., Ford, B., Cox, F.E.G., 2002. History of Human Parasitology. Proc. Natl. Acad. Sci. 19, 147–153. https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595

Smith, K.F., Guégan, J.-F., 2010. Changing Geographic Distributions of Human Pathogens. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 41, 231–250. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144634

Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. J. Fish Biol. 6, 197–208. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x

Soba, B., & Logar, J. (2008). Genetic classification of Cryptosporidium isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology*, *135*(11), 1263-1270.

Sokolow, S.H., Jones, I.J., Jocque, M., La, D., Cords, O., Knight, A., Lund, A., Wood, C.L., Lafferty, K.D., Hoover, C.M., Collender, P.A., Remais, J. V., Lopez-Carr, D., Fisk, J., Kuris, A.M., de Leo, G.A., 2017. Nearly 400 million people are at higher risk of schistosomiasis because dams block the migration of snail-eating river prawns. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 372. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0127

Sorensen, R.E., Minchella, D.J., 2001. Snail trematode life history interactions: past trends and future directions. Parasitology 123, S0031182001007843. https://doi.org/10.1017/S0031182001007843

Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect. Dis. 6, 411–25. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7

Summers, R.W., Elliot, D.E., Urban, J.F., Thompson, R., Weinstock, J. V., 2005. Trichuris suis therapy in Crohn's disease. Gut 54, 87–90. https://doi.org/10.1136/gut.2004.041749

Suon, S., Hol, D., Siek, S., McLean, M., Copeman, B., 2006. Seasonal differences in the incidence of infection with Fasciola gigantica in cambodian cattle. Trop. Anim. Health Prod. 38, 23–28. https://doi.org/10.1007/s11250-006-4340-5

Sures, B., 2004. Environmental parasitology: Relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. Trends Parasitol. 20, 170–177. https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.01.014

Sures, B., 2003. Accumulation of heavy metals by intestinal helminths in fish: An overview and perspective. Parasitology 126, 53–60. https://doi.org/10.1017/S003118200300372X

Tao, S., Monteiro, A.P.A., Thompson, I.M., Hayen, M.J., Dahl, G.E., 2012. Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. J. Dairy Sci. 95, 7128–7136. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5697

Tatem, A.J., Rogers, D.J., Hay, S.I., 2006. Global transport networks and infectious disease spread. Adv. Parasitol. 62, 293–343. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)62009-X.Global

Taylor, D.L., Kahawita, T.M., Cairncross, S., Ensink, J.H.J., 2015. The Impact of Water, Sanitation and Hygiene Interventions to Control Cholera: A Systematic Review. PLoS One 10, e0135676. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135676

Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, M.E., 2001. Risk factors for human disease emergence. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356, 983–989.

https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888

Tedcastle, A., Cawood, R., Di, Y., Fisher, K.D., Seymour, L.W., 2012. Virotherapy - Cancer targeted pharmacology. Drug Discov. Today 17, 215–220. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.011

Thomas, F., Poulin, R., 1998. Manipulation of a mollusc by a trophically transmitted parasite: Convergent evolution or phylogenetic inheritance? Parasitology 116, 431–436. https://doi.org/10.1017/S003118209800239X

Thomas, F., Poulin, R., Gu,gan, L.F., Michalakis, Y., Renaud, F., 2000. Are ther pros as well as cons to being parasitized. Parasitol. Today 16, 533–536.

Torgerson, P., Claxton, C., 1999. Epidemiology and control, in: Dalton, J.. (Ed.), Fasciolosis. CABI publishing, Wallingford, UK, pp. 113–151.

Trouve, S., Degen, L., Goudet, J., 2005. Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail Galba truncatula. J. Evol. Biol. 18, 358–370. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00831.x

Valero, M.A., Perez-Crespo, I., Periago, M.V., Khoubbane, M., Mas-Coma, S., 2009. Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by Fasciola hepatica and F. gigantica. Acta Trop. 111, 150–159. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.04.005

van der Knaap, W.P.W., Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snails interactions. Parasitol. Today 6, 175–182.

Van Der Voort, M., Van Meensel, J., Lauwers, L., Van Huylenbroeck, G., Charlier, J., 2015. The relation between input-output transformation and gastrointestinal nematode infections on dairy farms. Animal 10, 274–282. https://doi.org/10.1017/S1751731115002074

van der Voort, M., Van Meensel, J., Lauwers, L., Vercruysse, J., Van Huylenbroeck, G., Charlier, J., 2014. A stochastic frontier approach to study the relationship between gastrointestinal nematode infections and technical efficiency of dairy farms. J. Dairy Sci. 97, 3498–3508. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7444

Van Leeuwen, C.H.A., Huig, N., Van Der Velde, G., Van Alen, T.A., Wagemaker, C.A.M., Sherman, C.D.H., Klaassen, M., Figuerola, J., 2013. How did this snail get

here? Several dispersal vectors inferred for an aquatic invasive species. Freshw. Biol. 58, 88–99. https://doi.org/10.1111/fwb.12041

Van Valen, L., 1973. A new evolutionary law. Dep. Biol. .The Univ. Chicago 30, 1–30.

Vanschoenwinkel, B., Gielen, S., Vandewaerde, H., Seaman, M., Brendonck, L., 2008. Relative importance of different dispersal vectors for small aquatic invertebrates in a rock pool metacommunity. Ecography (Cop.). 31, 567–577. https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2008.05442.x

Vanschoenwinkel, B., Waterkeyn, A., Nhiwatiwa, T., Pinceel, T., Spooren, E., Geerts, A., Clegg, B., Brendonck, L., 2011. Passive external transport of freshwater invertebrates by elephant and other mud-wallowing mammals in an African savannah habitat. Freshw. Biol. 56, 1606–1619. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02600.x

Vareille-Morel, C., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., 2007. Les habitats des Lymnaeidae sur sols acides : A propos de quelques observations dans la région Limousin sur une trentaine d ' années 154–157.

Vareille-Morel, C., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., 1999. The characteristics of habitats colonized by three species of Lymnaea (Mollusca) in swampy meadows on acid soil : their interest for control of fasciolosis. Ann. Limnol. - Int. J. Limnol. 35, 173–178. https://doi.org/10.1051/limn/1999024

Vazquez-Prieto, S., Vilas, R., Paniagua, E., Ubeira, F.M., 2015. Influence of life history traits on the population genetic structure of parasitic helminths: a minireview. Folia Parasitol. (Praha). 62. https://doi.org/10.14411/fp.2015.060

Vázquez, A., Lounnas, M., Sánchez, J., Alba, A., Milesi, A., Hurtrez-Boussès, S., 2016. Genetic and infective diversity of the liver fluke Fasciola hepatica (Trematoda: Digenea) from Cuba. J. Helminthol. 90, 719–725. https://doi.org/10.1017/S0022149X15001029

Viana, D.S., Santamaría, L., Michot, T.C., Figuerola, J., 2013. Migratory strategies of waterbirds shape the continental-scale dispersal of aquatic organisms. Ecography (Cop.). 36, 430–438. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07588.x

Vicente, J., Delahay, R.J., Walker, N.J., Cheeseman, C.L., 2007. Social organization

and movement influence the incidence of bovine tuberculosis in an undisturbed high-density badger Meles meles population. J. Anim. Ecol. 76, 348–360. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01199.x

Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J.M., Fernandez-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C., 2007. Original article Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. Vet. Res. 38, 451–464. https://doi.org/10.1051/vetres

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. Infect. Genet. Evol. 12, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.010

Villafuerte, R., Calvete, C., Gortázar, C., Moreno, S., 1994. First Epizootic of Rabbit Hemorrhagic Disease in Free Living Populations of Oryctolagus Cuniculus At Doñana National Park, Spain. J. Wildl. Dis. 30, 176–179. https://doi.org/10.7589/0090-3558-30.2.176

Villalba, J.J., Miller, J., Ungar, E.D., Landau, S.Y., Glendinning, J., 2014. Ruminant self-medication against gastrointestinal nematodes: evidence, mechanism, and origins. Parasite 21, 31. https://doi.org/10.1051/parasite/2014032

Vittecoq, M., 2012. Maladies infectieuses emergentes au sein des zones humides mediterraneennes dans le contexte des changements globaux. Tesis Dr.

Vittecoq, M., Thomas, F., Jourdain, E., Moutou, F., Renaud, F., Gauthier-Clerc, M., 2014. Risks of emerging infectious diseases: Evolving threats in a changing area, the mediterranean basin. Transbound. Emerg. Dis. 61, 17–27. https://doi.org/10.1111/tbed.12012

Walker, A.J., 2006. Do trematode parasites disrupt defence-cell signalling in their snail hosts? Trends Parasitol. 22, 154–159. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.003

Walker, S.M., Johnston, C., Hoey, E.M., Fairweather, I., Borgsteede, F.H.M., Gaasenbeek, C.P.H., Prodohl, P.A., Trudgett, A., 2011. Potential rôle of hares in the spread of liver fluke in the Netherlands. Vet. Parasitol. 177, 179–181. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.043

Waterkeyn, A., Pineau, O., Grillas, P., Brendonck, L., 2010. Invertebrate dispersal by aquatic mammals: A case study with nutria Myocastor coypus (Rodentia, Mammalia) in Southern France. Hydrobiologia 654, 267–271. https://doi.org/10.1007/s10750-010-0388-3

WHO, 2007. The “neglected” neglected worms. Action Against Worms 1–8.

Wittebole, X., De Roock, S., Opal, S.M., 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence 5, 209–218. https://doi.org/10.4161/viru.25991

Wolfe, N.D., Dunavan, C.P., Diamond, J., 2007. Origins of major human infectious diseases. Nature 447, 279–283. https://doi.org/10.1038/nature05775

Woolhouse, M.E.J., Gowtage-Sequeria, S., 2005. Host range and emerging and reemerging pathogens. Emerg. Infect. Dis. 11, 1842–1847. https://doi.org/10.3201/eid1112.050997

World Health Organization, 2008. The Global Burden of Disease: 2004 update. 2004 Updat. 146. https://doi.org/10.1038/npp.2011.85

Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G., Van Ree, R., 2002. Parasites and the hygiene hypothesis. Science (80-.). 296, 490–494. https://doi.org/10.1385/CRIAI:26:1:15

Zickovich, J.M., Bohonak, A.J., 2007. Dispersal ability and genetic structure in aquatic invertebrates: A comparative study in southern California streams and reservoirs. Freshw. Biol. 52, 1982–1996. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01822.x

Ziegler, A.D., Petney, T.N., Grundy-Warr, C., Andrews, R.H., Baird, I.G., Wasson, R.J., Sithithaworn, P., 2013. Dams and Disease Triggers on the Lower Mekong River. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, 5–8. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002166

Article 1. Impact of Human Activities on Fasciolosis Transmission. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.08.004 **Sabourin, E**., Alda, P., Vázquez, A., Hurtrez-Boussès, S., Vittecoq, M.

Publié dans Trends in Parasitology

Trends in Parasitology

CellPress REVIEWS

Review

Impact of Human Activities on Fasciolosis Transmission

Emeline Sabourin,[1,2,*] Pilar Alda,[2,3] Antonio Vázquez,[4] Sylvie Hurtrez-Boussès,[2,5] and Marion Vittecoq[1,2]

Fasciolosis is a worldwide disease caused by the liver fluke *Fasciola* spp. This food- and water-borne disease is a major public health and veterinary issue. It is currently (re)emerging in several regions mainly due to the rapid evolution of human activities. This article reviews the current knowledge of the impact of irrigation-system management, livestock management, and human diet and hygiene habits on the emergence of fasciolosis. We also identify the gaps in this knowledge and the possible solutions for limiting these impacts. Integrated control seems to be the most effective solution for controlling fasciolosis, because it enables monitoring, prevention, and rapid action in case of the (re)emergence of the disease.

Highlights

Fasciolosis is a neglected water- and food-borne disease. There are approximately 17 million human cases annually in the world. In some areas, these numbers may be underestimated.

This disease has an important worldwide distribution due to parasite proliferation in a wide range of freshwater snail species and domestic as well as wild mammals, including humans.

Fasciolosis is also considered to be a major veterinary problem because it is responsible for significant losses of productive capacity in livestock (meat and milk).

The (re)emergence of fasciolosis in certain countries can be explained by the recent evolution of human activities, such as the building of irrigation systems, livestock management, the use of unsafe water, and raw vegetable consumption.

A Neglected Disease with a Significant Burden

Infectious diseases have emerged and re-emerged over the last hundred years, resulting in a complex public health crisis. These (re)emergences are largely due to anthropic disturbances, which modify pathogen dynamics by creating new contacts between hosts, favouring parasite dispersal and intensifying selection pressure on parasites [1,2]. Water-borne diseases (e.g., bilharzia, cholera, and fasciolosis) are particularly sensitive to human disturbance. Indeed, massive urbanization, expansion of irrigated areas, and transformation of natural wetlands in agricultural lands are all likely to promote the (re)emergence of water-borne diseases, which have major impacts on human health. For instance, the use of inadequately treated wastewater in irrigation and faecal sludge in soil amendment or fertilization are often associated with an elevated prevalence of intestinal helminth infections and diarrhoeal diseases in both workers and food consumers [3]. In order to reduce the impact of human activities on health, we need to better understand the mechanisms that drive water-borne diseases.

Water-borne diseases transmitted by trematodes are found throughout the world and have a strong impact on the economy and health [1,4]. Trematodes have complex life cycles involving vertebrates as definitive hosts and usually, almost as a rule, snails as the first intermediate host [5]. Trematodes infect more than one billion people and cause more than 600 million **disability-adjusted life years (DALYs)** (see Glossary) annually [6,7]. Many human activities increase the risk of becoming infected by trematodes. For instance, the development and management of water resources increase the prevalence of schistosomiasis and fasciolosis in several tropical areas [3,8,9].

Fasciolosis is a water- and food-borne disease caused by two trematodes: the liver flukes *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *F. hepatica* has a worldwide distribution, while *F. gigantica* transmission is limited to certain areas in Africa and Asia [10–17]. These two species also coexist in some areas where mixed infections and hybridization have been reported [18–20]. More literature exist about *F. hepatica* transmission since it is considered as the

[1]Institut de recherche de la Tour du Valat, Arles, France
[2]MIVEGEC, University of Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France
[3]Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina
[4]Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Ciudad de La Habana, Cuba
[5]Département de Biologie-Ecologie, Faculté des Sciences, University of Montpellier, Montpellier, France

*Correspondence: emeline.sabourin@gmail.com (E. Sabourin).

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

species that causes most fasciolosis cases in both human and livestock worldwide [3]. The distinction of the two species can be difficult depending on the diagnosis methods [21,22]. Thus, the prevalence of *F. gigantica* might be underestimated, and the development of a fast molecular diagnosis to differentiate the two species will be essential for effective control and prevention. The life cycle of *Fasciola* spp. involves a very wide range of domestic and wild mammals (sheep, cattle, horse, camel, coypu, rabbit etc.) including humans as the definitive host [3] (Figure 1). The intermediate host is a snail that inhabits bodies of freshwater. Major sources of infection for definitive hosts are plants associated with water or spring water [23]. Indeed, the metacercariae (i.e., infective stages) can encyst on the surface of water and aquatic plants [24]. Fasciolosis affects mainly people living in poverty, mostly children, without adequate sanitation and in close contact with livestock. It is considered as a highly **neglected tropical disease**[i]. At present, estimates for all continents reach 17 million people infected [25]. However, the number is probably underestimated in many countries, particularly in Asia and Africa [26]. The real number of cases could be between 35 and 72 million people, with more than 180 million people at risk of infection [27]. Fasciolosis is re-emerging in certain areas. For example, in Vietnam, 500 human cases were reported in 12 provinces in 2000, while over 20 000 cases were observed in 52 provinces in 2012[ii]. Diagnosing fasciolosis is not particularly easy in numerous countries where many diseases affect human populations. Moreover, in some rural areas, most infected inhabitants cannot go to medical centres for diagnosis, and misdiagnosis may sometimes occur due to insufficiently suggestive symptomatology [28,29] (Box 1). Both aspects have already been noted in several human fasciolosis-endemic areas in Bolivia, Peru, Mexico, and Egypt. As is true of other neglected diseases, fasciolosis infections are usually nonfatal, clinically mild, and not reported, but they are disabling diseases that maintain or increase poverty with 197 000 DALYs estimated [30].

Fasciolosis is also considered to be a major veterinary problem since it is responsible for important losses in the productive capacity of livestock (meat and milk) [31]. For instance, in the Irish and UK farming industry, fasciolosis is responsible for the annual loss of over £80 million [32]. The liver flukes cause serious digestive illness, anaemia, and sometimes cirrhosis, which can be lethal in livestock [33]. Treatment is long and expensive, and cases of parasite resistance have been described [34]. Liver flukes have a great ability to proliferate in a wide range of different freshwater ecosystems. Indeed, fasciolosis is recognized to have a worldwide latitudinal and longitudinal distribution [30]. This wide distribution makes it possible to study its parasite dynamics in different habitats with diverse definitive and intermediate hosts. Yet, it greatly complicates disease control, because solutions must be adapted to very different environmental and socioeconomic contexts.

The purpose of this review is to assess the existing knowledge on the effects of human activities and habits on the risk of fasciolosis. We focus on three groups of human activities that are mentioned in the literature as the main factors affecting fasciolosis: (i) irrigation-system management, (ii) livestock management, and (iii) human diet and hygienic habits. For each of these activities, we gathered available data to highlight knowledge gaps and perspectives and to identify solutions that may help mitigate the risk of fasciolosis transmission through preventive measures and control strategies.

Irrigation-System Management

Similar to other vector-borne diseases, such as malaria or schistosomiasis, the vectors of fasciolosis tend to proliferate in man-made irrigation systems, leading to severe consequences on human and animal health [11,26,35]. Liver flukes, unlike most trematodes, infect a wide range of intermediate hosts living in a wide range of freshwater habitats (irrigation canals,

Glossary

Disability-adjusted life years (DALYs): one DALY can be thought of as one lost year of 'healthy' life. The sum of these DALYs across the population, or the burden of disease, can be thought of as a measurement of the gap between the current health status and an ideal health situation, in which the entire population lives to an advanced age, free of disease and disability.

Integrated parasite control: a system of control which considers the preservation of the ecosystem and human health. It integrates all control methods (chemical, biological, physical etc.), limiting the utilization of chemical products except if no other method is available.

Neglected diseases: these diseases include a diverse group of communicable diseases that affect humans in tropical and subtropical countries. They involve more than one billion people and cost developing economies billions of dollars every year. Populations living in poverty, without adequate sanitation, and in close contact with infectious vectors, domestic animals, and wildlife are those worst affected.

Preventive chemotherapy: this is defined as the administration of a single safe medicine, either alone or in combination with other medicines, as a public health intervention to prevent selected neglected tropical diseases.

Self-fertilization: fertilization of female gametes by male gametes from the same individual, as by sperm from the same animal in hermaphroditic species or by pollen from the same plant.

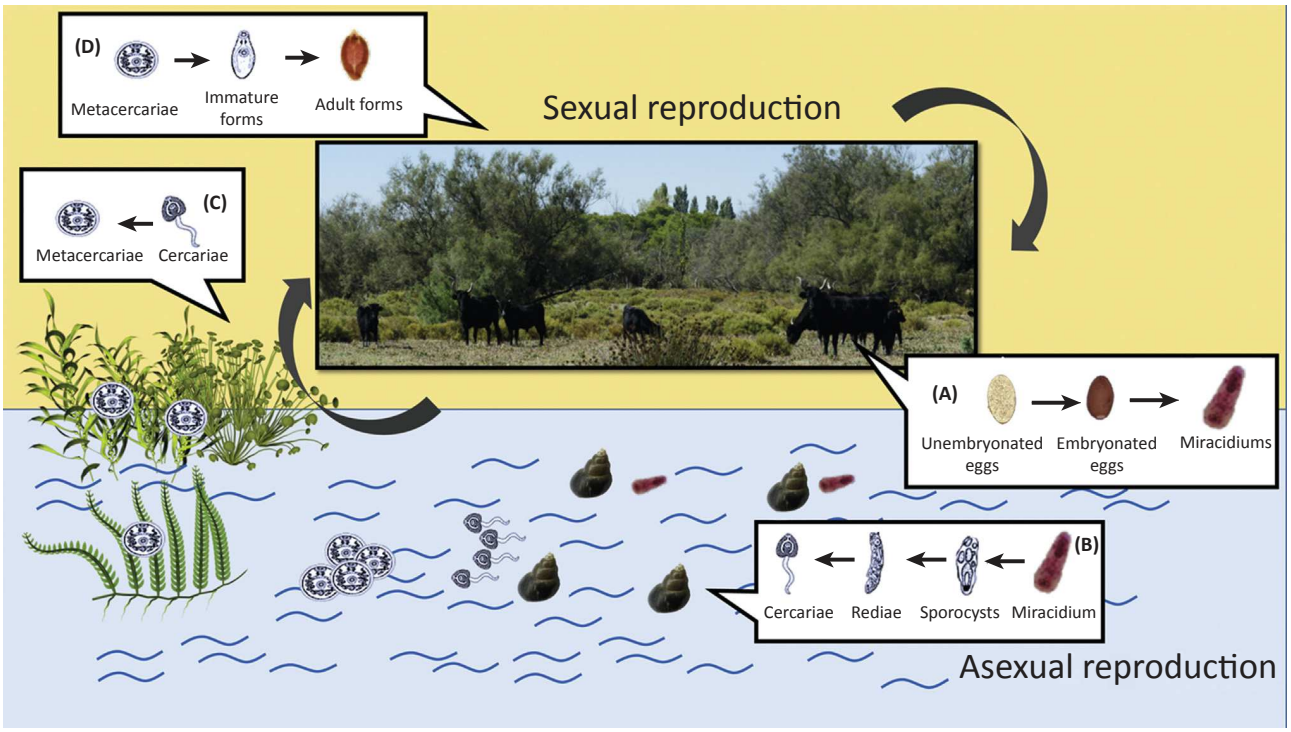


Figure 1. *Fasciola* spp. Transmission Cycle. (A) First unembryonated eggs are released via the faeces of the definitive host. Once in the water, the eggs become embryonated and release miracidium larvae that will swim to the intermediate host, a freshwater snail. (B) The miracidium enters an intermediate host and begins its asexual reproduction, first through the sporocyst stage then as rediae and cercariae. The mature cercariae leave the snail. (C) The cercariae encyst, preferably on the vegetation or on the surface of the water. The encysted stages are metacercariae. (D) These metacercariae will be ingested by the definitive host, through drinking water or eating aquatic plants. Once in the mammal, the metacercariae migrate into the bile ducts to reach their adult form. Sexual reproduction then takes place and produce eggs that come out through the digestive tract and faeces.

ditches, rivers, dams, and lakes) [36,37]. These intermediate hosts belong to several species of freshwater snails, mainly within the family Lymnaeidae [38], but also within the family Planorbidae [39] and the terrestrial group Succineidae [40]. Most of the snail species recognized to be major vectors of fasciolosis reproduce by **self-fertilization,** which leads to a great capacity to quickly colonize new habitats or recolonize after extinction events [41–43]. For example, the vector of fasciolosis, *Pseudosuccinea columella*, which is probably native to North America, colonized South America, Africa, Europe, and the Pacific islands in less than a century [42]. Another vector, *Galba truncatula,* invaded the Bolivian Altiplano during the 20th century, inducing the highest hyperendemic level of fasciolosis recorded so far [44]. Human activities linked to freshwater ecosystems are a relevant dispersal factor notably due to natural and artificial connections between rivers and irrigation canals facilitating the installation of freshwater invaders [45,46]. This high invasiveness has probably facilitated the worldwide expansion of fasciolosis.

For instance, in Senegal, hydroagricultural improvements and dam construction have led to significant environmental modifications (creation of reservoirs and irrigation canals), which in turn have created favourable conditions for the proliferation of the snail species *Radix natalensis* and *Biomphalaria pfeifferi*, the intermediate hosts of *F. gigantica* and *Schistosoma mansoni*,

Box 1. Fasciolosis Diagnosis

Diagnosis in Humans

There are various diagnostic methods for fasciolosis, depending on different stages and manifestations of the disease: acute phase or chronic phase [27].

The typical symptoms in the acute phase include fever, nausea, a swollen liver, and extreme abdominal pain.

During the chronic phase, the symptoms are intermittent pain, jaundice, and anemia.

People with symptoms are usually diagnosed by using several of the complementary diagnostic tests described below. Imaging (ultrasound) and detection in stools by PCR can also be used.

If there is a potential risk of contamination, systematic screening can be used in a population. In this case only one technique is used, usually based on stool analysis.

Blood Test Diagnosis

During the acute phase, a simple blood test is possible; fasciolosis is suspected if a high number of specific white blood cells (called eosinophils) are found.

Diagnosis by Detecting Eggs in Faeces

The Kato-Katz technique is a quantitative method for detecting parasite eggs in stool samples. It is simple, rapid, and inexpensive, making it an option suitable for field conditions and large-scale studies. It is a specific but not very sensitive diagnostic test that is unable to diagnose the disease during the incubation and acute phases [90].

Diagnosis by ELISA

Immunological tests allow diagnosis of fasciolosis by detecting specific antigens in serum and stool samples, such as FES-Ag (*Fasciola* excretory-secretory antigens). Serological tests, such as Fas2-ELISA or CL1-ELISA, are able to detect the circulating IgG antibodies. These techniques are highly sensitive and specific [90]. The intermittent clinical signs and symptoms of fascioliasis can be confused with those of other hepatobiliary disorders, causing delayed and difficult diagnosis.

Diagnosis in Animals

Animal symptoms are anaemia, weight loss, decreased fertility, and mortality in young individuals [31].

The health of the herd can be tested by sampling faeces randomly or by using an immunological test on milk. Individuals can also be tested if they show symptoms.

Diagnosis by Detecting Eggs in Faeces

Coprological sedimentation methods are routinely used for diagnosis of animal infection, and methods such as FLOTAC [93] are available.

Diagnosis by ELISA

Many immunological techniques having high sensitivity, reproducibility, and cost-effectiveness can be used on stools, milk, or serum samples [77]. A few examples of these tests are the SVANOVIR ELISA, MM3-Sero ELISA, and MM3-COPRO ELISA [94–97].

Innovations

Molecular diagnostic methods are still under development to increase the sensitivity and the specificity of conventional diagnostic tests. One of the new methods is the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay which would make it possible to detect fluke DNA in stool faster and easier than by PCR, but with an equal level of sensitivity [98].

respectively [47]. In the Peruvian Altiplano, the construction of irrigation and drainage canals caused the proliferation of lymnaeid snails and consequently a higher prevalence of fasciolosis [48]. Unlike irrigation canals that permanently conduct water, drainage canals can become dry so there is no typical aquatic vegetation. However, lymnaeids can live in both habitats because they can survive severe droughts [43]. Indeed, lymnaeid species are amphibious; *G. truncatula* and *Galba cubensis* can live in dry habitats by burrowing partially or completely into the soil [49,50]. In Spain, the government of the autonomous community of Castilla y León has funded the installation of modern irrigation systems to encourage new crops since 1990. Man-made modifications of the environment have contributed to the creation of new habitats for the intermediate hosts and have favoured the emergence of fasciolosis [51]. These studies show that such constructions induce a higher sanitary risk. However, irrigation-system management can be combined with other parameters, which can increase the exposure period of infection. For example, in Pakistan, the first annual peak of fasciolosis is associated with artificial irrigation but the second peak is driven by rainfall [52]. Despite some insights into how irrigation-system management promotes snail proliferation and consequently increases the prevalence of fasciolosis, very few studies have been carried out both before and after the installation of irrigation. Preliminary epidemiological studies before the construction are needed to evaluate the epidemiological risks of any man-made irrigation.

Which Solutions Can Limit Intermediate Host Proliferation in Irrigation Systems?

Dams and irrigation canals are used to develop agriculture and the economy. Therefore, we need to assess the trade-off between the benefits and the cost of irrigation systems. One of the solutions proposed to prevent fasciolosis in regions with dams and irrigation canals is to prevent the proliferation of the intermediate host.

One solution is the use of molluscicides, which was highly recommended during the 1970s but has been abandoned because most products are toxic for the macrofauna that inhabit the freshwater environment [31,53]. Only a few studies have been conducted to test natural molluscicides [54,55]. A recent study on a new biomolluscicide, *Citrullus colocynthis,* shows that it kills the snail vector of fasciolosis, *G. truncatula* and also the larvae of *F. hepatica* without affecting the associated fauna of the snail [56].

Another solution proposed is the use of biological control. Population dynamics studies are important for biological control strategies because they allow us to know the high mortality and reproduction seasons of freshwater snails; this information is needed for the effective introduction of biological agents (predators, competitors) [57,58]. Rondelaud *et al.* [59] used the predator mollusc *Zonitoides nitidus* to eliminate lymnaeid snails *G. truncatula* and *Omphiscola glabra*. This practice was not effective, probably because of the complexity of applying this method in the wild by nonspecialists, and the variations in snail population dynamics as a function of the environmental conditions (temperature and rainfall).

The last method is physical control, which involves cleaning canals by removing aquatic vegetation. This cleaning can be very effective because it can be durable and selective against specific snail species. The most relevant requirement is to target all the habitats covered by macrophytes and algae where the snails live because a single snail propagule can rapidly recolonize the whole irrigation system. This technique can be applied if canals are regularly cleaned and if they are not damaged. Poor maintenance of canals can lead to rapid recolonization by snails [60]. Indeed, if the canals are not cleaned properly, plants containing parasite eggs will be left on site and snails can remain in sediment, allowing them to rapidly recolonize

the habitat. Moreover, by dispersing eggs, some birds and aquatic mammals can favour the spread of freshwater snails, leading to the recolonization of certain areas [61,62].

Any single control strategy cannot effectively reduce fasciolosis transmission. **Integrated parasite control** programs are needed to limit fasciolosis. In Peru, dairy cattle producers decreased the prevalence of *F. hepatica* in cattle from 63% to 14% in 2 years by applying an integrated parasite control program [63]. They achieved this control not only through the improved drainage of ditches, but also through training sessions on fasciolosis, including manuals with calendars stating the correct use and administration of antiparasitic treatment, technical assistance with follow up visits, and strategically timed treatments. Irrigation canals were cleaned and the slope of the canal banks was increased to approximately 130°. These steps allowed sun rays to fall on the bottom and sides of the ditches for the longest possible duration, reducing the shaded areas where the snails *Galba viator* (called *Fossaria viatrix* in the article) were located.

Livestock Management

Every integrated parasite control program must also take account of the management of the definitive host. The occurrence of fasciolosis in herds is positively correlated with the presence of snail habitats including streams, irrigation canals, and dams [64]. Indeed, herds become infected when eating aquatic plants or drinking water contaminated with *Fasciola* metacercariae. Grazing and water access are thus key factors in the spread of fasciolosis. It has been shown that the risk of fasciolosis increases in regions with long grazing seasons [65]. In temperate zones, seasonal transmission can be observed when the temperature is appropriate and water is available for snail reproduction, hence, for parasite development [31]. In tropical zones, herds are more easily in contact with liver flukes during the rainy season [52]. During the dry season, herd management permits contact between herds and parasites. For instance, in Tanzania, infection rates of *F. gigantica* and paramphistomes were higher in villages where herds grazed freely in irrigated crops [14].

All of these factors play a role in the small scale of one farm, but the trade of animals between farms may also contribute to spreading fasciolosis [66,67]. Moreover, the expansion of fasciolosis around the world has been shaped by the continuous export of livestock [30]. For instance, ITS-1 and ITS-2 sequences do not differ between Bolivian and Spanish strains of *F. hepatica*, and they exhibit only a few differences with liver-fluke samples in other parts of the world [68], suggesting recent exchanges between populations, most probably due to livestock trade [69]. Common mitochondrial restriction fragment length polymorphism (RFLP) haplotypes have been consistently found in the Republic of Ireland, Greece, and Australia [70]. In many European and African countries, a seasonal movement of people with their herds occurs between seasons. For instance, when animals move from Iranian lowlands (usually contaminated with *F. gigantica*) to the neighbouring highlands (usually contaminated with *F. hepatica*), animals become coinfected with both parasite species [71]. The risk of fasciolosis can be limited through the management of those habitats and/or through the adaptation of livestock management. Many methods are available for limiting the transmission of fasciolosis to livestock.

How Can Livestock Management Be Adapted to Controlling Fasciolosis Risk?

Every integrated parasite control program is a three-step process. First, animals, pastures, and periods of high risk should be identified at each farm. Second, a combination of measures adapted to each farm should be taken. Since each farm might experience different conditions, it

is essential to identify the risk on each farm, and to set up the appropriate integrated solution. Finally, fasciolosis prevalence and the emergence of anthelmintic resistance should be regularly monitored to assess the effectiveness of the measures and to readapt them if necessary.

Measures of control include the regulation of grazing, anthelmintic treatments, and consideration of tolerance or genetic resistance to the parasite. First, farmers can limit the access of herds to snail habitats. It is possible to isolate herds from water sources at risk by fencing [72], and also by adding water tanks that are regularly cleaned to avoid snail invasion. However, this method is not always effective because, during the rainy season, snails can move to fenced habitats and then develop in ditches made by cattle trampling [53]. For example, snail migrations over 30 m have been observed from one spring swamp, in the middle of a pasture grazed by dairy cows, to puddles at the edge of the pasture [72]. Recent studies have explored the use of very high-resolution satellite and drone imagery to map small water bodies and populations of intermediate host snails in pastures, but further research is required to make this approach operational, and to give advice that is adapted to the situation of a specific local farm [73,74].

Second, the risk of infection can also be reduced by moving animals to uncontaminated pastures and avoiding grazing with fodder supplementation [75]. However, resources are sometimes scarce and there are not always enough pastures available to feed animals. Thus, other methods such as anthelmintic treatments can be used. In sub-Saharan Africa, nomadic pastoralists use the banks of Lake Chad as herd pastures. A study shows that animals that have grazed near the lake for long periods have a high risk of infection [76]. Limiting the access to the lake is impossible since no alternative source of water or grazing resources exist nearby, which means that the alternative solution is to treat cattle with triclabendazole (TCBZ), or other drugs against liver flukes. Yet, there is an increasing resistance of liver flukes to anthelmintics, in particular to TCBZ, which is the most widely used drug [77]. Before 2011, TCBZ resistance has been reported in sheep and cattle in six farms in Australia, Scotland, Wales, The Netherlands, Spain, and the Republic of Ireland. Since then, 24 other farms have also reported resistance to this anthelmintic in Northern Ireland, Scotland, Wales, Australia, New Zealand, Peru, and Argentina [34]. Alternative chemical options are available to target TCBZ-resistant flukes, including treatment with clorsulon, nitroxynil, closantel, albendazole, or oxyclozanide, according to the host species [34,77]. Nevertheless, it is important to use alternative chemicals more strategically than how TCBZ has been used historically to avoid the emergence of new resistances. For example, the annual rotation of drugs usually prevents the development of resistance, particularly if the drugs are from different classes and act differently [78]. Farmers can also select the animals to be treated. They can treat the most vulnerable animals (for instance, the youngest) to reduce the number of individuals treated and thus the selection pressure leading to resistance. It is also important to set up surveillance systems that monitor infection status at farm level on a regular basis (Box 1). For instance, one study shows that such longitudinal monitoring approaches can be an effective decision support tool for reducing infections on Irish farms [79]. However, the increasing resistance to the limited number of available flukicides makes finding an alternative control method crucial. Vaccines have been considered as a promising and economically viable alternative strategy for the control of fasciolosis in livestock [80,81], but more research is needed before they can be used [77].

Anthelmintic treatments can be coupled with pasture rotation [82]. This method is feasible if the habitats of intermediate hosts are well identified and some safe and uncontaminated pastures are available. Cattle can graze in safe pastures during spring and autumn when the risk of

getting infected is low, and can then be treated before moving to contaminated pastures during summer. However, the risk of promoting resistance to anthelmintics is high, because flukes would be in contact with recently treated cows. Thus, if eggs are eventually shed they will all come from resistant strains [72]. There are also some alternative methods to chemical treatments, such as deworming plants (*Agrimonia eupatoria*, *Urtica dioica*, *Calendula officinali*), but they must be combined with good livestock management, including the rotation of herds between pastures and safe and uncontaminated food and water[iii].

Finally, another tool for fasciolosis control is to manage herd genetic resources to enhance the resistance or tolerance to fasciolosis in livestock populations. It has been shown that native populations may be resistant to certain diseases. For example, Red Massai sheep are resistant and resilient to gastrointestinal nematodes [83], and some sheep breeds are resistant to *F. gigantica* – such as the Indonesian thin-tailed sheep. In contrast, this breed is susceptible to *F. hepatica* [84,85]. This resistance and resilience can be explained by hundreds of years of coevolution between the parasites and the hosts, but this tool must be part of an integrated management program. Moreover, in rural zones, herds are regularly in contact with humans, promoting the emergence of fasciolosis in human populations.

Human Diet and Unhygienic Habits

The transmission of fasciolosis to humans is linked to water and food. Drinking unsafe water, eating raw or undercooked contaminated vegetables, and applying inappropriate agricultural practices are the main reasons for the (re)emergence or persistence of fasciolosis in human populations worldwide [3]. In some countries (Vietnam, Bolivia, Iran, Egypt, Ethiopia), high incidence of human fasciolosis is explained by the extensive breeding of livestock in close contact with humans combined with the traditional consumption of watercress, an aquatic plant in which larvae of *Fasciola* spp. usually become encysted [18,86]. Vietnamese rural populations have a higher prevalence of fasciolosis than urban populations because people drink water and eat aquatic plants from water bodies that are in close contact with livestock [18]. In Argentina, several outbreaks of fasciolosis were caused by the ingestion of watercress naturally growing along river and stream beds that is collected during recreational activities [28].

Inappropriate agricultural practices can also promote the emergence and persistence of fasciolosis. For instance, farmers in Ethiopia irrigate vegetables during the dry season, promoting a good environment for snail proliferation; it results in the appearance of endemic fasciolosis [19] (Figure 2). In Ghana and Egypt, unsafe water is used for plant irrigation, leading to the contamination of plants by *F. hepatica* [87]. People can also become infected with *Fasciola* spp. if they have no access to safe water inside their homes and use water from irrigation and drainage canals for their needs: drinking, cooking, personal hygiene, cleaning, and washing [9,19].

In most countries, not only habits but also socioeconomic factors can explain the (re)emergence and persistence of fasciolosis. Sometimes, the risk of infection may vary widely among different groups of people and villages, based on cultural, environmental, and socio-economic differences. In Bolivia, people become infected mostly by eating uncooked contaminated aquatic plants. Bolivian children eat watercress and other aquatic plants when they help their parents in farming activities, while in Peru children become infected mostly by drinking contaminated water while playing in drainage canals [9,88,89]. This illustrates why public health policies must identify the main risk factors prevailing in different contexts: aquatic plant consumption, irrigation of crops with contaminated water, and the use of irrigation canals for human needs.



Figure 2. A Case Study, the Work of Fentie *et al*. in Ethiopia [19]. Growing vegetables is crucial in the region (A). Irrigation canals are built to irrigate fields, but these canals can also favour fasciolosis transmission because they can be contaminated by animal faeces and are good habitats for freshwater snails. Fields can be contaminated during irrigation, infesting the people who consume raw vegetables or drink unsafe water due to no access to safe water. (B) Local people breed sheep, cattle, or horses. Animals are close to humans. (C,D) Domestic animals drink in irrigation canals and rivers, which are also used by humans. Moreover, in this study, the same factors play a role in both fasciolosis and schistosomiasis transmission. This example shows that it is important to consider each risk factor to limit disease emergence. Indeed, the factors described above can be linked to each other. In this case, integrated control can be a good solution for the fight against schistosomiasis and fasciolosis transmission in both humans and livestock.

Which Strategies Can Be Implemented to Prevent Fasciolosis in Humans?

Once the risk factors are identified, several strategies can be used to prevent fasciolosis.

Educational campaigns encouraging people to eat cooked vegetables rather than raw ones can be developed [48]. Indeed, health education is crucial for preventing diseases. For instance, in Central Vietnam, in a community where the prevalence of fasciolosis is high, health volunteers take training courses to improve their skills and knowledge of fasciolosis diagnosis, treatment, surveillance, and management in order to detect and manage cases of fasciolosis (Box 1). At the same time, in the community and at schools, a campaign has been organized to raise public awareness about the parasite's life cycle, transmission, impacts, and control measures (Tran Minh Quy, Doctor of Public Health thesis, University of Wollongong, 2016). Health education was combined with human chemotherapy, vector control, pasture management, and animal treatment, permitting a significant decrease in the prevalence of fasciolosis.

The establishment of a drinking water and sewage-treatment system besides irrigation canals is very important [19,48], and **preventive chemotherapy** with TCBZ [90] is also possible. This method is used by the WHO as the main way to control most of the trematodes, which has proven effective and safe when the medicine is administered as a single-dose tablet in highly-endemic areas (where individual diagnosis is complicated) [90]. TCBZ reduces the rate of egg production, but it must be coupled with other preventive strategies in order to be 100% effective. Most of the anthelmintics protect patients for only a short time; thus, this method should be part of a global preventive and treatment approach. Limiting the risk of fasciolosis infection is essential for patients. Monitoring the effectiveness of prevention methods with the implementation of regular diagnoses can reduce disease and help to better target treatments. Indeed, establishing a good diagnosis is essential. Various methods exist, but the most common one is stool examination for egg detection, which is still considered to be a conclusive diagnosis despite its low sensitivity [90]. Others methods include testing for eosinophilia,

Key Figure

Integrated Parasite Control

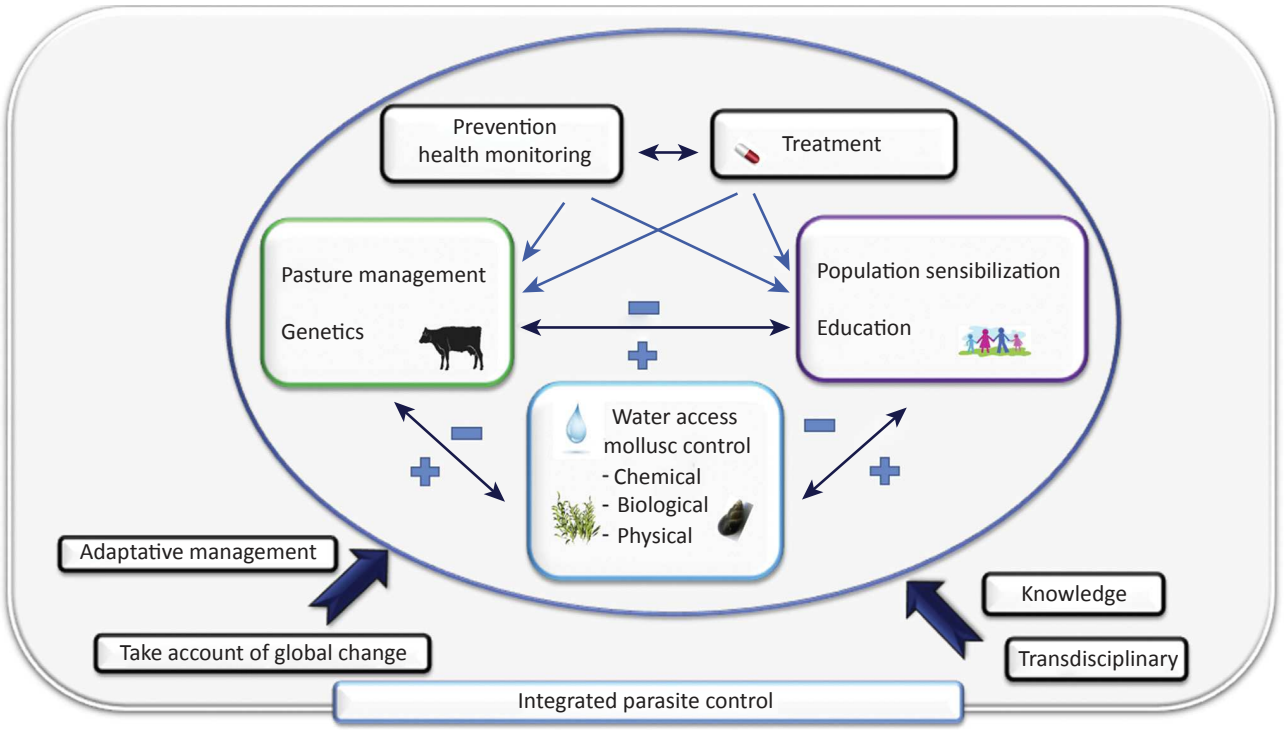


Figure 3. The three compartments of (i) water access (blue), (ii) livestock (green), and (iii) human habits (purple) can be linked to each other. It is important to have good management of all of these compartments to limit the emergence of fasciolosis. For that purpose, it is possible to monitor and prevent its circulation with several methods in the three parts. Treatments can be used for prevention in certain endemic areas in humans and animals. It is also important to promote transdisciplinary and integrated parasite control.

ultrasound, ELISA, and molecular approaches (Box 1). Such approaches detect infections rapidly and more accurately, but they are often more expensive and complicated [77,90,91].

If good preventative strategies have not been taken and humans are infected, they can be treated with TCBZ [90] or nitazoxanide. The latter is another drug used during the chronic stage of fasciolosis and for patients with low parasite burdens [29]. TCBZ resistance concerning humans has been reported in some endemic areas in The Netherlands, Chile, Turkey, and Peru [34].

Finally, in order to reduce the prevalence of the disease, it is important to control different factors and use several methods, such as vector control, health education, improvement of local health systems and chemotherapy [92] (Figure 3, Key Figure). In Central Vietnam, a study reported the effectiveness of an integrated control program on fasciolosis. This model could feasibly inform the initiatives in other countries where fasciolosis is prevalent (Tran Minh Quy, Doctor of Public Health thesis, University of Wollongong, 2016).

Concluding Remarks

Man-made constructions and livestock management can create good conditions for liver-fluke transmission. These new habitats can also favour the emergence of the disease in human populations due to human diets and unhygienic habits. The challenge of controlling fasciolosis can be met only if we deal with the complex interactions between the environment, hosts (snails, livestock, wildlife, humans), and human activities (see Outstanding Questions). It is essential to consider all of these factors, which are involved in a constantly changing world (climate, habitat fragmentation, pollution). The socioeconomic and ecological context of each country, region, city, and farm should be considered to prevent fasciolosis. Indeed, many studies focusing on schistosomiasis and other neglected tropical diseases have shown that applying an integrated control program is the most effective solution for preventing disease (re) emergence. The literature is still scarce regarding fasciolosis, and more systematic studies are needed. However, we believe that the key to successfully controlling this disease lies in applying good integrated control programs and local adaptive management practices.

Outstanding Questions

What are the wild reservoirs of fasciolosis? How do they contribute to endemicity, emergence or re-emergence?

How can the impact of wildlife on fasciolosis be assessed?

How do global changes impact fasciolosis transmission, and how do they affect the risks of (re)emergence?

What is the distribution of vectors at the global and local scale? How is it impacted by human activities?

What are the compatibilities between liver flukes and definitive hosts (wild versus domestic)?

How can we effectively combine awareness-raising, prevention, and monitoring to limit fasciolosis emergence in human populations? What are the interactions of fasciolosis with other diseases in humans, livestock, and wild animals?

How do we evaluate which socioeconomic and ecological contexts can increase the risk of the emergence of fasciolosis?

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to Jean-Pierre Pointier for valuable discussions on earlier drafts of the manuscript as well as to the reviewers for their constructive remarks. This study was financially supported by Labex CeMeb, the Tour du Valat, and the INEE CNRS through the Ecosan funding program.

Resources

[i] http://who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/Newsletter10.pdf

[ii] www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/news_events/Parasite%20report%20final%20draft-25October2012.pdf

[iii] www.parc-camargue.fr/newsletter/guide_technique_2.pdf

References

1. Taylor, L.H. *et al.* (2001) Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356, 983–989
2. Jones, K.E. *et al.* (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–994
3. Cotruvo, J.A. *et al.*, eds (2004) *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes, and Control*, IWA Publishing
4. Rim, H.J. *et al.* (1994) Food-borne trematodes: Ignored or emerging? *Parasitol. Today* 10, 207–209
5. Keiser, J. and Utzinger, J. (2009) Food-borne trematodiases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 466–483
6. Fürst, T. *et al.* (2012) Global burden of human food-borne trematodiasis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12, 210–221
7. Hotez, P.J. *et al.* (2008) Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J. Clin. Invest.* 118, 1311–1321
8. Steinmann, P. *et al.* (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.* 6, 411–425
9. Esteban, J.G. *et al.* (2002) High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Trop. Med. Int. Health* 7, 339–348

10. Morozova, E.V. *et al.* (2004) Polymorphism of the ND1 and CO1 mitochondrial genes in populations of liver fluke *Fasciola hepatica*. *Russ. J. Genet.* 40, 817–820
11. Walker, S.M. *et al.* (2011) Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. *Parasitology* 138, 215–223
12. Mekky, M.A. *et al.* (2015) Human fascioliasis: A re-emerging disease in Upper Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 76–79
13. Dreyfuss, G. *et al.* (2005) *Fasciola hepatica*: Epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitol. Res.* 95, 278–282
14. Nzalawahe, J. *et al.* (2015) Associations between trematode infections in cattle and freshwater snails in highland and lowland areas of Iringa Rural District, Tanzania. *Parasitology* 142, 1–10
15. Keyyu, J.D. *et al.* (2005) Epidemiology of *Fasciola gigantica* and amphistomes in cattle on traditional, small-scale dairy and large-scale dairy farms in the southern highlands of Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 37, 303–314
16. Rojas, L. *et al.* (2010) Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends Parasitol.* 26, 26–34
17. Chen, J.X. *et al.* (2013) An outbreak of human *Fascioliasis gigantica* in Southwest China. *PLoS One* 8, e71520
18. Bui, T.D. *et al.* (2015) Current status of fasciolosis in Vietnam: an update and perspectives. *J. Helminthol.* 1, 1–12
19. Fentie, T. *et al.* (2013) Epidemiology of human fascioliasis and intestinal parasitosis among schoolchildren in lake Tana Basin, northwest Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107, 480–486
20. Ashrafi, K. *et al.* (2015) The endemicity of human fascioliasis in Guilan province, northern Iran: The baseline for implementation of control strategies. *Iran. J. Public Health* 44, 501–511
21. Saijuntha, W. *et al.* (2018) Revealing genetic hybridization and DNA recombination of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in nuclear introns of the hybrid *Fasciola* flukes. *Mol. Biochem. Parasitol.* Published online July 3, 2018. http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.06.004
22. Periago, M.V. *et al.* (2008) First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infect. Genet. Evol.* 8, 51–58
23. Hurtrez-boussès, S. *et al.* (2001) Dynamics of host–parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes Infect.* 3, 841–849
24. Andrew, S. (1999) The life cycle of *Fasciola hepatica*. In *Fasciolosis* (Dalton, J., ed.), pp. 1–29, CABI
25. Valero, M.A. *et al.* (2009) Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Trop.* 111, 150–159
26. Mas-Coma, S. (2005) Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J. Helminthol.* 79, 207–216
27. Nyindo, M. and Lukambagire, A.H. (2015) Fascioliasis: an ongoing zoonotic trematode infection. *BioMed Res. Int.* 2015, 8
28. Mera y Sierra, R.L. *et al.* (2011) Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasit. Vectors* 4, 104
29. Zumaquero-Ríos, J.L. *et al.* (2013) Fascioliasis and intestinal parasitoses affecting schoolchildren in Atlixco, Puebla State, Mexico: epidemiology and treatment with Nitazoxanide. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2553
30. Fürst, T. *et al.* (2012) Trematode Infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 399–419
31. Torgerson, P. and Claxton, C. (1999) Epidemiology and control. In *Fasciolosis* (Dalton, J., ed.), pp. 113–151, CABI
32. Mulcahy, G. and Dalton, J.P. (2001) Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet. Sci.* 70, 83–86
33. FAO/WHO (2014) Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. *Microbiol. Risk Assess. Ser.* 23, 302
34. Kelley, J.M. *et al.* (2016) Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol.* 32, 458–469
35. Prepelitchi, L. *et al.* (2011) (Gastropoda: Lymnaeidae) in Wetlands of Northeastern Argentina. *Zool. Stud* 50, 164–176
36. Pointier, J.P. *et al.* (2009) Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of Fasciola hepatica in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 790–796
37. Vásquez, A. *et al.* (2009) Distribución y preferencia de hábitats de moluscos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* 61, 248–253
38. Correa, A.C. *et al.* (2010) Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evol. Biol.* 10, 381
39. Hamed, N. *et al.* (2009) Natural infection of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae) in *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae) in northern Tunisia. *J. Helminthol.* 83, 271–273
40. Relf, V. *et al.* (2009) Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family Succineidae in Ireland. *Vet. Parasitol.* 163, 152–155
41. Trouve, S. *et al.* (2005) Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail *Galba truncatula*. *J. Evol. Biol.* 18, 358–370
42. Lounnas, M. *et al.* (2017) Self-fertilization, long-distance flash invasion and biogeography shape the population structure of *Pseudosuccinea columella* at the worldwide scale. *Mol. Ecol.* 12, 3218–3221
43. Meunier, C. *et al.* (2004) Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity (Edinb.)* 92, 316–322
44. Meunier, C. *et al.* (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Mol. Ecol.* 10, 1333–1340
45. Lodge, D.M. *et al.* (1998) Predicting impact of freshwater exotic species on native biodiversity: challenges in spatial scaling. *Aust. J. Ecol.* 23, 53–67
46. Loo, S.E. *et al.* (2007) Freshwater invasions: Using historical data to analyse spread. *Divers. Distrib.* 13, 23–32
47. Diaw, O.T. *et al.* (1990) Prolifération de mollusques et incidence sur les trématodoses dans la région du delta et du lac de Guiers après la construction du barrage de Diama sur le fleuve Sénégal. *Helminthologie* 43, 499–502
48. Esteban, J.G. *et al.* (2003) Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages in the Nile Delta of Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 429–437
49. Moukrim, A. and Rondelaud, D. (1992) Vertical spatial behabiour patterns of lymnea truncatula in relation with origin of snails, infection with *Fasciola hepatica*, and experimental environment. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 6, 174–179
50. Alba, A. *et al.* (2016) Assessment of the FasciMol-ELISA in the detection of the trematode *Fasciola hepatica* in field-collected *Galba cubensis*: a novel tool for the malacological survey of fasciolosis transmission. *Parasit. Vectors* 9, 22
51. Martínez-Valladares, M. *et al.* (2013) Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasit. Vectors* 6, 282
52. Afshan, K. *et al.* (2014) Impact of climate change and man-made irrigation systems on the transmission risk, long-term trend and seasonality of human and animal fascioliasis in Pakistan. *Geospat. Health* 8, 317–334
53. Rondelaud, D. *et al.* (2009) *La limnée tronquée: – Un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire.* (1st edn), Presses universitaires de Limoges
54. Singh, A. and Agarwal, R.A. (1988) Possibility of using latex of euphorbiales for snail control. *Sci. Total Environ.* 77, 231–236
55. Hammond, J.A. *et al.* (1994) Eucalyptus: A sustainable self delivery molluscicide? *Vet. Res. Commun.* 18, 359–365
56. Chawech, R. *et al.* (2016) A study of the molluscicidal and larvicidal activities of *Citrullus colocynthis* L. leaf extract and its

main cucurbitacins against the mollusc *Galba truncatula*, intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Pest Manag. Sci.* 73, 1473–1477

57. Perera, G. *et al.* (1990) Effectiveness of three biological control agents against intermediate hosts of snail-mediated parasites in Cuba. *Malacol. Rev.* 23, 47–52
58. Perera, G. *et al.* (1993) Biological control of snail intermediate hosts by competitor thiarid snails in Cuba. *J. Med. Appl. Matacol.* 97, 97–101
59. Rondelaud, D. *et al.* (2006) The control of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) by the terrestrial snail Zonitoides nitidus on acid soils. *Biol. Control* 39, 290–299
60. Chlyeh, G. *et al.* (2006) Spatio-temporal distribution of freshwater snail species in relation to migration and environmental factors in an irrigated area from Morocco. *Hydrobiologia* 553, 129–142
61. Waterkeyn, A. *et al.* (2010) Invertebrate dispersal by aquatic mammals: A case study with nutria *Myocastor coypus* (Rodentia, Mammalia) in Southern France. *Hydrobiologia* 654, 267–271
62. Viana, D.S. *et al.* (2013) Migratory strategies of waterbirds shape the continental-scale dispersal of aquatic organisms. *Ecography* 36, 430–438
63. Raunelli, F. and Gonzalez, S. (2009) Strategic control and prevalence of *Fasciola Hepatica* in Cajamarca, Peru. A Pilot Study. *J. Appl. Res. Vet.* 7, 145–152
64. Schweizer, G. *et al.* (2007) Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Vet. Parasitol.* 150, 164–169
65. Novobilský, A. *et al.* (2015) Impact of meteorological and environmental factors on the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in beef cattle herds in Sweden. *BMC Vet. Res.* 11, 128
66. Martins, I.V.F. *et al.* (2014) of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23, 23–29
67. Olsen, A. *et al.* (2015) Prevalence, risk factors and spatial analysis of liver fluke infections in Danish cattle herds. *Parasit. Vectors* 8, 160
68. Mas-Coma, S. *et al.* (2001) *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology* 123, S115–S127
69. Semyenova, S.K. *et al.* (2006) Genetic differentiation in Eastern European and Western Asian population of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial NAD1 andd COX1 genes. *J. Parasitol.* 92, 525–530
70. Walker, S.M. *et al.* (2007) Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitol. Res.* 101, 117–125
71. Ashrafi, K. *et al.* (2015) Distribution of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in the endemic area of Guilan, Iran: Relationships between zonal overlap and phenotypic traits. *Infect. Genet. Evol.* 31, 95–109
72. Knubben-Schweizer, G. and Torgerson, P.R. (2015) Veterinary parasitology bovine fasciolosis: control strategies based on the location of Galba truncatula habitats on farms. *Vet. Parasitol.* 208, 77–83
73. De Roeck, E. *et al.* (2014) Fine-scale mapping of vector habitats using very high resolution satellite imagery: A liver fluke case-study. *Geospat. Health* 8, S671–S683
74. Charlier, J. *et al.* (2014) Longitudinal study on the temporal and micro-spatial distribution of *Galba truncatula* in four farms in Belgium as a base for small-scale risk mapping of *Fasciola hepatica*. *Parasit. Vectors* 7, 528
75. Suon, S. *et al.* (2006) Seasonal differences in the incidence of infection with *Fasciola gigantica* in Cambodian cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 23–28
76. Vreni, J. *et al.* (2014) Prevalence of *Fasciola gigantica* infection in slaughtered animals in south-eastern Lake Chad area in relation to husbandry practices and seasonal water levels. *BMC Vet. Res.* 10, 81
77. Beesley, N.J. *et al.* (2017) *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound. Emerg. Dis.* Published online October 6, 2017. http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12682
78. Fairweather, I. (2011) Reducing the future threat from (liver) fluke: Realistic prospect or quixotic fantasy? *Vet. Parasitol.* 180, 133–143
79. Munita, M.P. *et al.* (2016) Six-year longitudinal study of *Fasciola hepatica* bulk milk antibody ELISA in the dairy dense region of the Republic Ireland. *Prev. Vet. Med.* 134, 16–25
80. Molina-Hernández, V. *et al.* (2015) *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101–111
81. Toet, H. *et al.* (2014) Liver fluke vaccines in ruminants: Strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915–927
82. Knubben-Schweizer, G. *et al.* (2010) Control of bovine fasciolosis in dairy cattle in Switzerland with emphasis on pasture management. *Vet. J.* 186, 188–191
83. Baker, R.L. and Gray, G.D. *et al.* (2004) Appropriate breeds and breeding schemes for sheep and goats in the tropics. In *Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia* (Sani, R., ed.), pp. 63–95, ACIAR Monograph N°113
84. Roberts, J.A. *et al.* (1997) Acquisition of resistance against *Fasciola gigantica* by Indonesian thin tail sheep. *Vet. Parasitol.* 73, 215–224
85. Pleasance, J. *et al.* (2011) Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunol.* 33, 495–505
86. Raissy, M. and Ansari, M. (2012) Seroprevalence of human fasciolosis in a new-emerging focus of fasciolosis in Yasuj District, Southwest of Iran. *Iran. J. Parasitol.* 7, 73–79
87. Amoah, P. *et al.* (2005) Irrigated urban vegetable production in Ghana: Sources of pathogen contamination and health risk elimination. *Irrig. Drain.* 54, S49–S61
88. Parkinson, M. *et al.* (2007) Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Epidemiol. Infect.* 135, 669
89. Esteban, J.G. *et al.* (1997) Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Trop.* 66, 1–14
90. WHO (2007) *Report of the WHO Informal Meeting on Use of Triclabendazole in Fascioliasis Control,* pp. 1–31, WHO
91. Cwiklinski, K. *et al.* (2016) A prospective view of animal and human fasciolosis. *Parasite Immunol.* 38, 558–568
92. Molyneux, D.H. (2006) Control of human parasitic diseases: context and overview. *Adv. Parasitol.* 61, 1–45
93. Cringoli, G. *et al.* (2010) FLOTAC: New multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat. Protoc.* 5, 503–515
94. Charlier, J. *et al.* (2007) Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 78, 57–66
95. Mezo, M. *et al.* (2010) Field evaluation of the MM3-SERO ELISA for detection of anti-*Fasciola* IgG antibodies in milk samples from individual cows and bulk milk tanks. *Parasitol. Int.* 59, 610–615
96. Mezo, M. *et al.* (2004) An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (Mm3). *J. Parasitol.* 90, 845–852
97. Martínez-Sernández, V. *et al.* (2016) Rapid enhanced MM3-COPRO ELISA for detection of *Fasciola* coproantigens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–20
98. Martínez-Valladares, M. and Rojo-Vázquez, F.A. (2016) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions. *Parasit. Vectors* 9, 73

Article 2. How hydrographic networks and habitat stability influence the population structure of the fasciolosis intermediate host, *Galba truncatula.*

Sabourin, E., Boutron, O., Lounnas, M., Alda, P., Vázquez, Caty, C., Vittecoq., M.Hurtrez-Boussès, S

Article en préparation

Do hydrographic networks and habitat stability influence the population structure of the freswater snail *Galba truncatula*, vector of fasciolosis?

Emeline Sabourin [1, 2], Olivier Boutron[1], Manon Lounnas[2], Pilar Alda[2, 3], Antonio Vázquez[2,4], Céline Caty[2], Marion Vittecoq[1], Sylvie Hurtrez-Boussès [2, 5],

[1] Institut de recherche de la Tour du Valat, Arles, France.

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

[3] Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

[4] Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Ciudad de La Habana, Cuba.

[5] Département de Biologie-Ecologie, Faculté des Sciences, University of Montpellier, Montpellier, France.

Corresponding author: **emeline.sabourin@gmail.com** (E. Sabourin)

ABSTRACT :

1. During the last hundred years, the modification and the management of water infrastructures and natural aquatic ecosystems has caused of the emergence or reemergence of several waterborne diseases, including trematodoses. Among these trematodoses, fasciolosis is particularly affected by freshwater ecosystem disturbances. Indeed, in Europe, its intermediate host, *Galba truncatula*, is a snail which reproduces by self-fertilization and is able to quickly colonize different freshwater habitats in drastic conditions.

2. The aim of our study was to investigate the influence of human water management on the dynamics of *G. truncatula* populations. To this end, we studied the impact of permanence of habitats and the effects of thydrographic network on the dispersion of *G.truncatula* and the structure of its populations.

3. We sampled snails in autumn and spring during three years (2015-2017) in the Camargue (Southern France). We collected 2159 snails belonging to 168 populations in three types of habitats connected or not to each other: (i) permanent habitats, (ii) semi-permanent habitats, (iii) temporary habitats. Each snail was genotyped using eight variable microsatellite loci.

4. This study shows the influence of water temporal variation in habitats and the effects of connexion in the hydrological network on the dispersal and genetic structure of the populations of *G. truncatula*.. This result has strong potential applications on water management issues in order to limit the risks of transmission of fasciolosis. To conclude, this study underlines the need to take into account the water infrastructures and their management in the implementation of disease prevention and control.

Keywords: water management, hydrographic network, *Galba truncatula, Fasciola hepatica*, genetic structure, dispersion.

Introduction

Among the wide diversity of ecosystems, the aquatic systems are the most affected by anthropic perturbations and are therefore highly endangered by disequilibrium. Indeed, hence 2025, over half of the world population will face stress of water supply and/or water quality (réf?). The water requirements in the world are important whether for human consumption, agriculture or farming can lead to landscape and management water modifications. This modifications can modify the biodiversity with increase of invasion or disparition species. Indeed, freshwater ecosystems are particularly vulnerable to biological invasions (Lodge et al., 1998). Human activities related to these ecosystems, such as fishkeeping, fishing, or boat trips, are important dispersal factors for invertebrates (Lodge et al., 1998; Loo et al., 2007). Among the species that can disperse easily, molluscs have a high invasion capacity, several families of snails (Physidae, Thiaridae, Planorbidae and Lymnaidae) have been accidentally introduced into North America and many other parts of the world via the aquarium market (Cowie and Robinson, 2003; Pointier and Augustin, 1999).Moreover, Several mollusk species are involved in the transmission of many infectious diseases for humans and animals. For example, several species of the lymnaidae family are intermediate hosts of F.hepatica and F.gigantica. These trematodes induce fasciolosis (Corea et al., 2010). This trematodosis whose re-emergence is linked, among other things, to the recent invasion of new environments by freshwater molluscs and to modifications in agricultural practices can induce an important impact in human and veterinary health. In order to, conserve habitats and species, but also to control diseases and prevent risks. It is crucial to understand the environmental factors that play a role in population biology. In order to test this, the mollusk Galba truncatula, seems to be a biological model of choice. Indeed, it is the main intermediate host of fasciolosis in Europe. In addition, several studies have already shown the effect of spatial (connectivity) and temporal (impoundment / drought) characteristics on the population biology of G. truncatula.

Indeed, this species reproduces by self-fertilization. This characteristic allows them to quickly colonize different freshwater habitats, including both temporary and permanent habitats. (Meunier et al. 2004; Hurtrez-Boussès et al., 2010; Lounnas et al., 2017; Trouvé et al., 2005a). It also gives them the capacity to live in a great diversity of habitats such as lakes, rivers or artificial habitats (irrigation canals, ponds, ditches). However, habitats can influence the structure of population of G. truncatula. It is known that habitat permanence can affect snail population dynamics (Chapuis and Ferdy, 2012). Indeed, in temporary habitats snails may be more sensitive to drought in summer and frost in winter. A study by Goumghar et al (2001) showed that drought can reduce the survival rate of G. truncatula in populations from central France by 30 to 80%. Low temperatures in winter can also affect snail fitness by increasing growth and mortality (Roberts, 1950; Rondelaud, 1977). Populations in temporary habitats are therefore regularly subjected to major bottlenecks and extinction-recolonization dynamics. This extremely high genetic drift strongly reduces the genetic diversity and can lead to the fixation of one genotype per population (Jarne, 1995; C Meunier et al., 2004; Meunier et al., 2001; Mintsa Nguema et al., 2013; Nicot et al., 2008). The connectivity of habitats can also have an impact on the dynamics of snail populations. Indeed, the dispersal capabilities of freshwater snails are a directly related to landscape structure. Thus, a high connectivity between habitats may result in higher genetic similarity between populations (e.g. (Chlyeh et al., 2006; Wilson et al., 1999; Worthington Wilmer et al., 2008; Zickovich and Bohonak, 2007). Freshwater snails can disperse efficiently in water either actively by moving on the riverbed or passively by being carried away by the current (Hurtrez-Boussès et al., 2010; Rondelaud et al., 1983). Studies suggest that they could also be dispersed by waterbirds or mammals. All these studies have tested factors (degree of permanence connectivity) separately and in different areas, so it is interesting to be able to study the influence of spatial and temporal characteristics of habitats at the same time and on the same territory in order to have an integrative vision. The aim of our study was so to investigate the influence of human water management in the dynamics of *G. truncatula*. To this end, we studied the influence of the water temporal variation in habitats and the connexion of the hydrological network on the dispersion of a disease intermediate host as well as on the genetic structure of its populations.

For this purpose, we used eight microsatellite markers to assess the genetic structure of *G.truncatula* populations. We choosed the Mediterranean area and more particularly the Camargue which is a wide wetland in the midst of the Mediterranean basin experiencing from perpetual mutation, with an important cattle, rice and salt production. This area combines several characteristics of choice for our study. Indeed, the fasciolosis is recognize as be an essential problem in cattle production. Moreover, the Camargue has a complex water management with vast irrigation and drainage system. Hense, this region is composed of a vast constrast environment with temporal water variation habitats (flooded grassland, irrigation canals, ponds) and connectivity between them.

Thus, we have answered precisely the following questions: What is the prevalence of *F. hepatica* in *G. truncatula* in Camargue? What vegetation was suitable for the installation of *G. truncatula*? What is the impact of water variations in habitats on the genetic structure of *G. truncatula*? Does the connection between habitats have an effect on the structure of snail populations and their dispersal?

Study area

Sampling of snails took place in Camargue (Southern France) in the Tour du Valat's estate (Figure 1). The snails are sampled in three types of habitats: temporary, permanent and semi-permanent. (i) Temporary habitats include rainfed ditches and pools that dry out many times throughout the year. (ii) Permanent habitats do not experience drought and exist during the entire year, they are supplied by the irrigation and drainage canals. (iii) Finally, semi-permanent habitats may dry only during very harsh periods, which generally occur once or twice a year; they are supplied also by the irrigation and drainage permanent canals.

In our study area, a total of 2139 snails were collected between February 2014 – 2017, every autumn and spring. Snails were searched on canals banks and on ditches, pools and flooded pastures. They were detected visually and collected with clamps. Snails were sampled on 12 sites. A site is an area around an irrigation canal. In all sampling points, snails were collected at a very small scale (less than 5 m along the ditch), preventing the risk of sampling different sub-populations and thus avoiding Wahlund effects. 450 sampling points were examined to search the presence of snails.

Collected snails were immediately killed in water at 70°C, and then were preserved in 70% ethanol for further parasite screening and genetic analyses. Collected snails were tested for the presence of *F. hepatica* larvae (rediae or cercariae) through dissection under a stereomicroscope. The status of each snail (infected or uninfected) was then recorded. Larvae from infected snails were carefully removed and preserved in 70% ethanol for ulterior genetic analyses, which also served to confirm identification.

Molecular analyses

DNA was extracted using the Chelex® DNA extraction technique modified after Caron et al. (2011). Briefly, a portion (1mm3) of snail or parasite tissue was mixed with 2.5 µl of proteinase K (50mg/mL) (Promega, USA) and 100 µL of 5% Chelex® (BioRad USA), then vortexed and incubated overnight at 56◦C in T100TM ThermalCycler (BioRad). Afterwards, the mixture was incubated for 10min at 95°C and centrifuged at 10, 000×g for 5min. The supernatant was collected and stored at -20 °C. Then, each snail DNA extract was genotyped at eight variable microsatellite loci (9, 16, 21, 24, 36, 37, 32, 43, GenBank accession numbers AF226976, AF226978, AF226980, AF226981, AF226984, AF226985, AF226983 and AF226986 respectively), according to protocols described elsewhere (Trouvé et al., 2000; Meunier et al., 2001; Hurtrez-Boussès et al., 2010). Primers were labelled fluorescently to be used in an ABI-Prism 310 (Applera) automated sequencer. One ml of each PCR product was pooled together with 0.5 ml of internal size standard (GENESCAN 500 LIZ, Applera France), and diluted in Hi-Di Formamide (20 ml QSP) for automatic electrophoresis. Allele sizes were estimated using GeneMapper® v. 4.0 software (Applied Biosystems). PCR products used in previous studies (Trouvé et al., 2000 ; Meunier et al., 2004; Hurtrez-Boussès et al. 2010) served as references for sizing.

Data analyzes

Meteorological data, aquatic and bank vegetation, habitat type, accessibility for the cattle herd and GPS coordinates were recorded for each sampling time even if no snail was found during the visual search. To see if aquatic and bank vegetation have an effect on the presence of *G. truncatula*, a GLM analysis was performed with R. 3.3.2 (R Development Core Team).

The populations with small sample sizes (N<4; populations 71 out of 168) and with more 5 locus missing data were discarded from the population analyses to increase the

reliability of results. 1509 individuals belonging to 97 sampling points were therefore considered in these analyses. The genetic polymorphism of each population was determined using standard parameters, including number of polymorphic loci, observed heterozygosity (Ho) and gene diversity (He) (Nei, 1987). These parameters were estimated using GenoDive (Meirmans and Van Tienderen, 2004). We estimated the unbiased estimator f of Wright's Fis (Weir & Cockerham 1984), and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested using a randomization procedure (10,000 permutations of alleles among individuals in each population) using FSTAT 2.9.4 (Goudet 2003) available from http://www2.unil.ch/popgen/ softwares/fstat.htm. In addition, we estimated the average selfing rate per population as S = 2Fis/(1+Fis) (Hartl & Clark 1997), as well as with a method based on the distribution of multilocus heterozygosity implemented in RMES software (David et al., 2007). Linkage disequilibrium between pairs of loci was also assessed with FSTAT Fstat 2.9.3.2 software (Goudet, 1995; Goudet, 1999). When multiple tests were conducted, p-values are given after Bonferroni correction (Holm, 1979; Rice, 1989).

Allelic richness, Fis and gene diversities were compared among populations from permanent, temporary and semi-permanent habitats. Multiple comparisons were done using ANOVA followed by Tukey post-hoc tests with R.

Characterization of the hydrographic network

For hydrographic distances, hydrographic networks were digitalized with the QGIS software. There are three distinct networks. First, the permanent network which includes the channels between sampling points that are always connected and permanent in time. Second the temporary network, which includes populations that can be disconnected from the permanent network because the channels are drained part of the year or the channels are not connected every year to the rest of the network. The third network includes the permanent and temporary networks, i.e. with the permanent as well as the temporary sampling points, connected to the network independently of the direction of water flow.

To compute the shortest hydrographic distances between each pair of sampling locations we considered the theory of graphs (REF). Each of the three hydrographic networks and their associated sampling locations were considered as non-directed weighted graphs. Each node of the graph is a sampling location or a junction between

several channels. The weight between two nodes is the hydrographic distance determined with Qgis.

With the Dijkstra's algorithm from the python package NetworkX 2.1, we then computed the shortest paths (i.e the shortest hydrographic distance) between all the nodes for each of these 3 hydrographic networks.

Euclidean distances between sampling points were computed with the R package Vegan from the GPS coordinates. A square distance matrix was then created.

Population differentiations and Mantel Test

Differentiation between each pair of samples was estimated by computing FST values (Weir and Cockerham, 1984) and its significance evaluated using the randomization tests (10,000 permutations of alleles among populations) with FSTAT.

Mantel tests (Manly, 1991) implemented in the package Vegan under the software R were performed to assess isolation by distance (IBD), by testing the correlation between matrix of differentiation among all pairs of samples (FST/(1 - FST)) and matrix of euclidian (IBDf) or hydrographic (IBDh) distances.

Results

Ecology

Only eight of the 2139 *G.truncatula* sampled were found infected by larvae of *F. hepatica,* the determination has confirmed by PCR specific with specific primer ITS2 (REF). (global prevalence : 0.37%). The infected snails were sampled in three different sites. Nevertheless if we calculate the prevalence within each of these 3 sites, they are respectively of 3.8% (N =67), 3.2% (N=52) and 1.3% (N=31). In addition, the 3 sites where infected snails were found are two temporary and one semi-permanent pools.

The analysis of aquatic vegetation data revealed that the absence of *G. truncatula* is associated with the absences of aquatic vegetation and the presence of helophytes ($p<0.001$). In contrast, the presence of lymneid snails is significantly correlated with the presence of herbaceous vegetation on the bank ($p < 0.01$).

Population genetics

The eight studied loci proved to be polymorphic, harboring a low mean number of alleles (2.67± 0.67S.D.). The observed heterozygosity (Ho) varies between 0.09 and 0.274 (mean 0.12± 0.069 SD) and the gene diversity (He) was on average 0.4065 (± 0.100 SD) (Fig 2) . Allelic richness, observed (Ho) and expected (He) heterozygosities, Fis values and estimated selfing rates for each sample point are given in Supplementary file. Marked departures from HWE were observed in all populations, and the estimated selfing rate based on FIS values overall populations was high (0.669 ± 0.728 SD, p-value = 0.0001). However, a few populations displayed low selfing rates between 0.25 and 0.50 (mean 0.43 ± 0.07 SD; N =13). Consequently, we assume that only the self-fertilization is responsible for these deviations from Hardy- Weinberg equilibrium.

Fis was significantly higher in temporary habitats in comparison with permanent and semi-permanent habitat (P <0.0048). Temporary habitats have significantly lower He than semi-permanent habitats (P < 0.04). AR was significantly higher in semi-permanent than permanent habitats and temporary habitats (P<0.00006 and P<0.0009) (Table 1 and Figure 2).

Isolation by distance

The matrix of differentiation among populations (FST/(1 - FST)) was not significantly correlated to the matrix of Euclidian distances (r = 0.05, NS), whereas it was significantly correlated to the matrix of permanent hydrographic distances (r = 0.13, p < 0.05, Fig. 2). On the other hand, for the temporary network (habitats that are connected to the permanent network occasionally), there is significant isolation by Euclidean (r=0.45, p < 0.001) and hydrographic (r=0.49, p<0.001) distances. The Mantel test performed between the two temporary distance matrices revealeda significant correlation (r=0.9626, p<0.001). For populations of habitats not connected to temporary and permanent hydrographic networks, we did not detect isolation by Euclidian distance (r=0.5,NS).

Discussion

Ecology

Galba truncatula occurs in habitats composed of herbaceous and submerged hydrophytic plants. The absence of snail detection is significantly correlated with the total absence of vegetation on the banks and the presence of rush areas *(Juncus*

maritimus). These results diverge from those of Rondelaud et al (2009), who showed that snails are present in rush areas (*Juncus* spp.) and considered that this plant could be used as an indicator of fasciolosis risk. In Camargue, the species of rush (*Juncus maritimus*) found is different from the species of rushes (*Juncus acutiflorus, Juncus effusus*) found in study in Central France (Rondelaud 2009). *J. maritimus* is often present in wetlands; it is very tolerant to salinity, which could explain why there are no snails in these areas.

Infestation by F.hepatica

The overall prevalence of *F. hepatica* that we observed was very low (0.37%). However, if we consider the prevalence within the three contaminated sites, we found infection rates of 3.8%, 3.2% and 1.3% that are much closer to those described in the literature (Mage et al. 2002, Dreyfuss et al, 2014, Rondelaud et al 2001). In addition, the 3 sites with infected snails are temporary or semi-permanent ponds. The latter seems more likely to contain infected snails because they more easily meet the conditions required for transmission. It is true that they have a higher exposure and risk of infection than canals, in particular via two characteristics: accessibility for cattle and the possibility that dung stagnates in water. It is therefore possible that ponds are habitats where the risk of fasciolosis for herds would be greater in the Camargue than in the canals.
The low observed prevalence can also be explained by a bias in the sampling. Indeed, some populations are monitored annually but the peak of infection might cover only a short period of time. It would be interesting to target certain populations in the canals and ponds in order to follow them monthly to determine the peaks of infections (Chlyeh et al., 2006).
On the other hand, in Camargue, we found other snail species such as *Succinea* sp that can also act as intermediate host : this specie was previously found naturally infected with *F. hepatica* in Ireland(Relf et al., 2009). It has been suggested that this group of mollusks may play an important role in transmission when *G. truncatula* is not abundant. It would therefore be interesting to sample thise species in the future to find out what their role is in the transmission of *F. hepatica* in the Camargue.

Population genetics

Our study shows the same pattern as those previously described by studies in *G. truncatula*, i.e. very large departures from hardy-Weinberg equilibrium. However, these results differ slightly from those found in previous studies (Meunier et al., 2001; Meunier et al., 2004a; Trouvé et al., 2005b; Hurtrez-Boussès et al. 2010) conducted on populations from Bolivia, Spain, Morocco, Portugal , Switzerland, and France (Central and Languedoc-Roussillon regions). Indeed, in these studies, all estimated self-fertilization rates were above 80%, while in Camargue we found selfind rates ranging from 60% to 90%. Genetic diversity is also higher than in previous studies. This relatively high genetic diversity in the Camargue confirms that the presence of *G. truncatula* does not result from a recent invasion, unlike in the case of the Bolivian Altiplano where a study by Meunier (2001) showed its recent arrival. It also suggests that populations might be less subject to genetic drift than in other sites in France or Europe (Meunier et al. 2004b). However, this genetic diversity and the rate of self-fertilization can vary greatly within our study area from one habitat to another.

Indeed, population genetics parameters differ according to habitat types. In accordance with the study by Trouvé et al (2003), populations of snails in temporary habitats we found taht have lower genetic diversity and allelic richness compared to those found in semi-permanent and permanent habitats. This low genetic diversity can be explained by drastic population reductions with many bottlenecks leading to higher genetic drift (Meunier et al. 2004b). Populations are completely disconnected and the probability of recolonization is very low. In addition, in temporary habitats, populations harbour higher selfing rates. In such circumstances, self-fertilization can be interpreted as an assurance to reproduction and therefore to the maintenance of a population (Panell and Barrett 2001). Indeed, selferss, capable of rebuilding a population on their own, are expected to have a strong advantage–. Maintaining self-fertilization at high rates can therefore be adaptive in organisms living in temporary habitats. Lower self-fertilization rates in some populations of permanent and semi-permanent habitats could then be linked to greater stability of these habitats. The highest genetic diversity is recorded in semi-permanent habitats. As these populations are connected to each other for part of the year, they might be less sensitive to genetic drift as compared to temporary habitats: the supply of new propagules would be easier thanks to their connection to permanent habitats. Compared to permanent habitats, semi-permanent habitats are less stable, competition or predation

in permanent habitat may be more intense than in temporary environments increasing genetic drift in these habitats.

Influence of habitats

Indeed, population genetics parameters differ according to habitat types. In accordance with the study by Trouve et al (2003), populations of snails in temporary habitats have lower genetic diversity and allelic richness compared to those found in semi-permanent and permanent habitats. This low genetic diversity can be explained by drastic population reductions with many bottlenecks leading to higher genetic drift (Meunier et al 2001). Populations are completely disconnected and the probability of recolonization is very low. In addition, in temporary habitats, populations are more self-fertil. In such circumstances, self-fertilization ensures the maintenance of a population (Panell and Barrett 2001). Indeed, self-fertil individuals, capable of rebuilding a population on their own, are expected to have a strong advantage (Baker et al). Maintaining self-fertilization at high rates can therefore be adaptive in organisms living in temporary habitats. Lower self-fertilization rates in some populations of permanent and semi-permanent habitats could then be linked to greater stability of these habitats. The highest genetic diversity is recorded in semi-permanent habitats. Indeed, As these populations are connected to each other for part of the year, they would be less sensitive to genetic drift compared to temporary habitats because the supply of new propagule would be easier thanks to their connection to permanent habitats. While compared to permanent habitats, semi-permanent habitats are less stable, competition or predation in permanent habitat may be more intense than in temporary environments increasing genetic drift in these habitats.

Influence of hydrographic network

Our results indicate that there is isolation by hydrographic distance for populations in the permanent network while there is no isolation by Euclidean distances, which is consistent with the results of Hurtrez-Boussès et al. (2010). It can therefore be assumed that populations connected to each other by permanent hydrographic networks disperse more easily from one channel to another thanks to passive dispersal followibnng water flow (Hurtrez-Boussès et al. 2010) or to rheotacticc displacements (Rondelaud 1983,2006), which consists of snails moving on the riverbed. . On the other hand, for the temporary

network (habitats that are occasionally connected to the permanent network), there is isolation by Euclidean and hydrographic distances. This could be explained by the fact that these populations are more distant from each other: thus there is a strong correlation between hydrographic distances and Euclidean distances. The dispersal of snails in these populations might occur actively through displacements on the riverbed. They could also disperse passively by the current that can carry them away or by mammals or during prairie flooding in the fall and spring. (Kawata et al., 2005). Indeed, several studies have shown that mammals such as wild boars, elephants, buffaloes, ragweed and water birds (Viana et al., 2013) can carry eggs or invertebrates when they move between two water points, thus promoting the spread of freshwater snails; this leads to colonization between areas that can be very distant (Vanschoenwinkel et al., 2011, 2008; Waterkeyn et al., 2010). For populations of habitats not connected to temporary and permanent hydrographic networks, we did not detect any isolation by distance. Among the sampled sites, the populations of temporary habitats are much smaller than the others, so it is possible that we do not detect isolation due to a lack of statistical power.

Conclusion

Finally, this study confirms the importance of understanding the dynamics of the intermediate host to understanding the dynamics of the parasite and the whole cycle. For example, the installation of artificial irrigation networks can promote the rapid spread of snail genotypes sensitive to *F. hepatica*, and can therefore be a factor in the re-emergence of fasciolosis. This suggests the major role of water management and the hydrographic networks connectivity in dispersion and structure of *G.truncatula* populations. Thus, it underlines the need to take into account such considerations in installing water infrastructures and in irrigation network management. Moreover, if the water infrastructures exist, their management has to be taken into account in the implementation of disease prevention and control.

Acknowledgments:
We would like to express our gratitude to Jean-Pierre Pointier for valuable discussions on earlier drafts of the manuscript as well as to the reviewers for their constructive remarks. This study was financially supported by Labex CeMeb, the Tour du Valat and the INEE

CNRS through the Ecosan funding program. We gratefully acknowledge O.Pineau, the estate management team of the Tour du Valat, and T.Blanchon.

References

Anderson, R.M., May, R.M., Joysey, K., Mollison, D., Conway, G.R., Cartwell, R., H.V., T., Dixon, B., 1986. The invasion, persistence and spread of infections diseases within animal and plant communities. Philos. Trans. R. Soc. B-Biological Sci. 314, 533–570.

Andrew, S., 1999. The life cycle of fasciola hepatica, in: Dalton, J.. (Ed.), Fasciolosis. CABI pub, Wallingford, UK, pp. 1–29.

Burgarella, C., Gayral, P., Ballenghien, M., Bernard, A., David, P., Jarne, P., Correa, A., Hurtrez-Bousses, S., Escobar, J., Galtier, N., Glemin, S., 2015. Molecular evolution of freshwater snails with contrasting mating systems. Mol. Biol. Evol. 32, 2403–2416. https://doi.org/10.1093/molbev/msv121

Chapuis, E., Ferdy, J.B., 2012. Life history traits variation in heterogeneous environment: The case of a freshwater snail resistance to pond drying. Ecol Evol 2, 218–226. https://doi.org/10.1002/ece3.68

Chen, J.X., Chen, M.X., Ai, L., Xu, X.N., Jiao, J.M., Zhu, T.J., Su, H.Y., Zang, W., Luo, J.J., Guo, Y.H., Lv, S., Zhou, X.N., 2013. An Outbreak of Human Fascioliasis gigantica in Southwest China. PLoS One 8, e71520. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071520

Chlyeh, G., Dodet, M., Delay, B., Khallaayoune, K., Jarne, P., 2006. Spatio-temporal distribution of freshwater snail species in relation to migration and environmental factors in an irrigated area from Morocco. Hydrobiologia 553, 129–142. https://doi.org/10.1007/s10750-005-0968-9

Correa, A.C., 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 Evol. Biol. 10, 381. https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-381

Cotruvo, J.A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D.O., Craun, G.F.,

Fayer, R., Gannon, V.P.J. (Eds.), 2004. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes, and Control. IWA publishing.

David, P., Pujol, B., Viard, F., Castella, V., Goudet, J., 2007. Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. Mol. Ecol. 16, 2474–2487. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03330.x

Dreyfuss, G., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2005. Fasciola hepatica: Epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. Parasitol. Res. 95, 278–282. https://doi.org/10.1007/s00436-004-1269-3

Ganz, H.H., Ebert, D., 2011. Depend on Parasite Diversity 91, 1263–1268.

Garrett, K.A., Mundt, C.C., 1999. Epidemiology in Mixed Host Populations. Phytopathology 89, 984–990. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.11.984

Hurtrez-Bousses, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guegan, J.-F., Meunier, C., Bargues, M.-D., Mas-Coma, S., Renaud, F., 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (Fasciola hepatica). Mol. Ecol. Notes 4, 689–690. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00786.x

Hurtrez-Boussès, S., Hurtrez, J.E., Turpin, H., Durand, C., Durand, P., De Meeüs, T., Meunier, C., Renaud, F., 2010. Hydrographic network structure and population genetic differentiation in a vector of fasciolosis, Galba truncatula. Infect. Genet. Evol. 10, 178–183. https://doi.org/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.

Jarne, P., 1995. Mating system, bottlenecks and genetic-polymorphism In hermaphroditic animals. Genet. Res. 65, 193–207. https://doi.org/doi:10.1017/S0016672300033279

Kawata, M., Sawada, H., Yokoyama, J., 2005. The effects of spatial habitat structure on the evolution of density-dependent growth and reproduction in freshwater snails. Hyd 553, 229–241.

Keyyu, J.D., Monrad, J., Kyvsgaard, N.C., Kassuku, A.A., 2005. Epidemiology of Fasciola gigantica and amphistomes in cattle on traditional, small-scale dairy and

large-scale dairy farms in the southern highlands of Tanzania. Trop. Anim. Health Prod. 37, 303–314. https://doi.org/10.1007/s11250-005-5688-7

Khan, M.K., Sajid, M.S., Riaz, H., Ahmad, N.E., He, L., Shahzad, M., Hussain, A., Khan, M.N., 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. Parasitol. Res. 112, 2421–2430. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3464-6

Lounnas, M., Correa, A.., Vázquez, A.., Dia, A., Escobar, J.., Nicot, A., Arenas, J., Ayaqui, R., Dubois, M.., Gimenez, T., Gutiérrez, A., González-Ramírez, C., Noya, O., Prepelitchi, L., Uribe, N., Wisnivesky-Colli, C., Yong, M., David, P., Loker, E.., Jarne, P., Pointier, J.., Hurtrez-Boussès, S., 2017. Self-fertilization, long-distance flash invasion and biogeography shape the population structure of Pseudosuccinea columella at the worldwide scale. Mol. Ecol. 12, 3218–3221. https://doi.org/10.1111/ijlh.12426

Meirmans, P.G., Van Tienderen, P.H., 2004. GENOTYPE and GENODIVE: Two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. Mol. Ecol. Notes 4, 792–794. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00770.x

Mekky, M.A., Tolba, M., Abdel-Malek, M.O., Abbas, W.A., Zidan, M., 2015. Human fascioliasis: A re-emerging disease in Upper Egypt. Am. J. Trop. Med. Hyg. 93, 76–79. https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0030

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). Mol. Ecol. 13, 2535–2543. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02242.x

Meunier, C., Hurtrez-Boussès, S., Jabbour-Zahab, R., Durand, P., Rondelaud, D., Renaud, F., 2004. Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc Lymnaea truncatula (Gastropoda, Pulmonata). Heredity (Edinb). 92, 316–322. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800410

Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., Pointier, P., Jourdane, J., Renaud, F., 2001. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. Mol. Ecol. 10, 1333–

1340. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01284.x

Mintsa Nguema, R., Langand, J., Galinier, R., Idris, M.A., Shaban, M.A., Al Yafae, S., Moné, H., Mouahid, G., 2013. Genetic diversity, fixation and differentiation of the freshwater snail Biomphalaria pfeifferi (Gastropoda, Planorbidae) in arid lands. Genetica 141, 171–184. https://doi.org/10.1007/s10709-013-9715-8

Morozova, E. V., Chrisanfova, G.G., Arkhipov, I.A., Semyenova, S.K., 2004. Polymorphism of the ND1 and CO1 mitochondrial genes in populations of liver fluke Fasciola hepatica. Russ. J. Genet. 40, 817–820. https://doi.org/10.1023/B:RUGE.0000036534.01952.19

Nei, M., 1987. Genetic distance and molecular phylogeny. Popul. Genet. Fish. Manag.

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). Mol. Ecol. Resour. 8, 1281–1284. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02065.x

Nzalawahe, J., Kassuku, A.A., Stothard, J.R., Coles, G.C., Eisler, M.C., 2015. Associations between trematode infections in cattle and freshwater snails in highland and lowland areas of Iringa Rural District, Tanzania. Parasitology 1–10. https://doi.org/10.1017/S0031182015000827

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. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.003

Roberts, E.W., 1950. Studies on the life-cycle of fasciola hepatica (linnaeus) and of its snail host, limnaea (galba) truncatula (müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. Ann. Trop. Med. Parasitol. 44, 187–206. https://doi.org/10.1080/00034983.1950.11685441

Rojas, L., Vazquez, A., Domenech, I., Robertson, L.J., 2010. Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? Trends Parasitol. 26, 26–34. https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.10.005

Rondelaud, D., 1983. les réseaux de drainage superficiel et leur colonisation par lymnea truncatula Müller. A propos de quatre années d'observation en Haute-Vienne,

France.

Trouve, S., Degen, L., Goudet, J., 2005a. Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail Galba truncatula. J. Evol. Biol. 18, 358–370. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00831.x

Trouve, S., Degen, L., Goudet, J., 2005b. Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail Galba truncatula. J. Evol. Biol. 18, 358–370. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00831.x

Trouvé, S., Degen, L., Meunier, C., Tirard, C., Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Guégan, J.F., Goudet, J., Renaud, F., 2000. Microsatellites in the hermaphroditic . snailf 1662–1665.

Vanschoenwinkel, B., Gielen, S., Vandewaerde, H., Seaman, M., Brendonck, L., 2008. Relative importance of different dispersal vectors for small aquatic invertebrates in a rock pool metacommunity. Ecography (Cop.). 31, 567–577. https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2008.05442.x

Vanschoenwinkel, B., Waterkeyn, A., Nhiwatiwa, T., Pinceel, T., Spooren, E., Geerts, A., Clegg, B., Brendonck, L., 2011. Passive external transport of freshwater invertebrates by elephant and other mud-wallowing mammals in an African savannah habitat. Freshw. Biol. 56, 1606–1619. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02600.x

Viana, D.S., Santamaría, L., Michot, T.C., Figuerola, J., 2013. Migratory strategies of waterbirds shape the continental-scale dispersal of aquatic organisms. Ecography (Cop.). 36, 430–438. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07588.x

Walker, S.M., Johnston, C., Hoey, E.M., Fairweather, I., Borgsteede, F.H.M., Gaasenbeek, C.P.H., Prodohl, P.A., Trudgett, A., 2011. Potential rôle of hares in the spread of liver fluke in the Netherlands. Vet. Parasitol. 177, 179–181. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.043

Waterkeyn, A., Pineau, O., Grillas, P., Brendonck, L., 2010. Invertebrate dispersal by aquatic mammals: A case study with nutria Myocastor coypus (Rodentia, Mammalia) in Southern France. Hydrobiologia 654, 267–271. https://doi.org/10.1007/s10750-010-0388-3

Wilson, A.B., Naish, K.-A., Boulding, E.G., 1999. Multiple dispersal strategies of the invasive quagga mussel (Dreissena bugensis) as revealed by microsatellite analysis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 2248–2261. https://doi.org/https://doi.org/10.1139/f99-162

Worthington Wilmer, J., Elkin, C., Wilcox, C., Murray, L., Niejalke, D., Possingham, H., 2008. The influence of multiple dispersal mechanisms and landscape structure on population clustering and connectivity in fragmented artesian spring snail populations. Mol. Ecol. 17, 3733–3751. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03861.x

Zickovich, J.M., Bohonak, A.J., 2007. Dispersal ability and genetic structure in aquatic invertebrates: A comparative study in southern California streams and reservoirs. Freshw. Biol. 52, 1982–1996. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01822.x

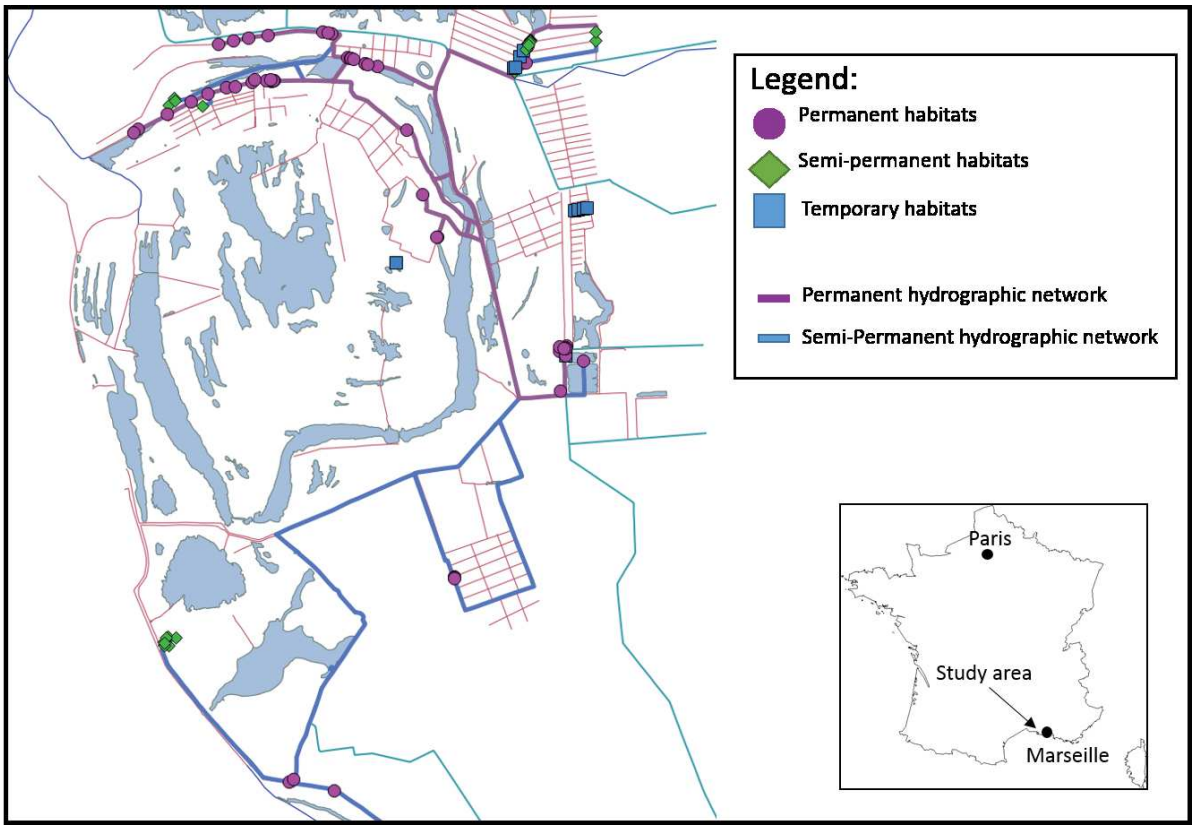


Figure 1: Location of different habitats in the studied network and representation of the permanent hydrographic network and the semi-permanent hydrographic network .

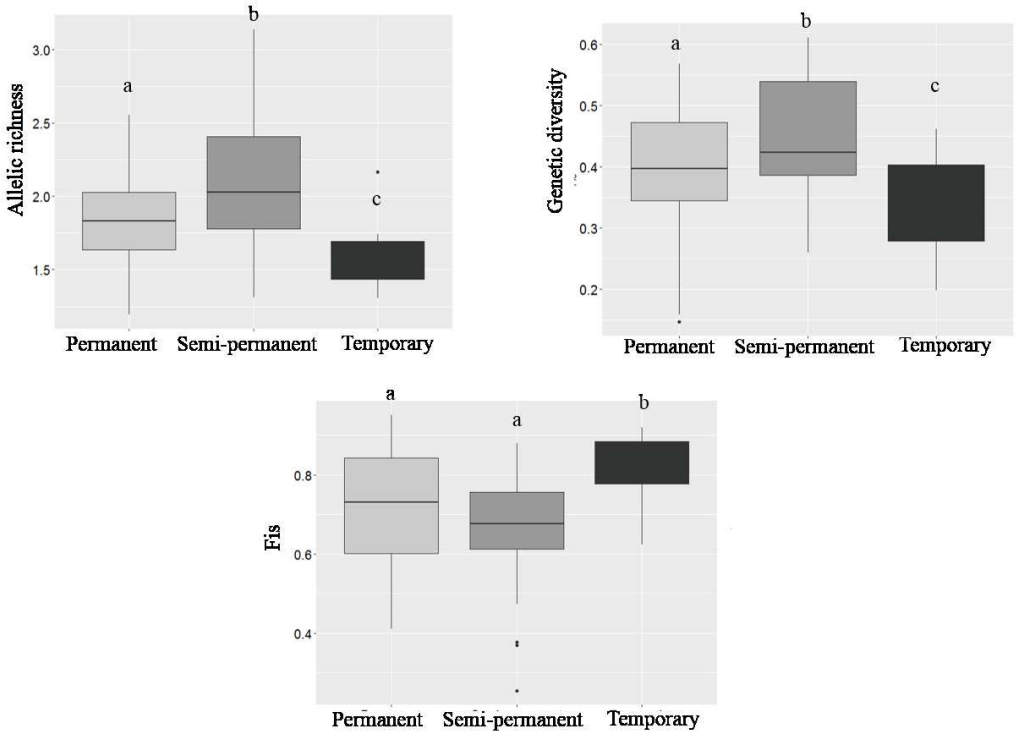


Figure 2: Boxplot of Fis, diversity genetics, richness allelic in the three different habitat types. The middle line represents the median, the top line is the 3rd quartile and the bottom line the 1st quartile. Letters indicate the significant differences

Habitats	N	Fis	Ar	Ho	He
Permanent	50	0,71(±0,15 SD)	1,82(±0,29SD)	0,11(±0,07SD)	0,39(±0,1SD)
Semi-Permanent	37	0,66(±0,14 SD)	2,13(±0,52SD)	0,15(±0,07SD)	0,44(±0,10SD)
Temporary	10	0,83(±0,09 SD)	1,61(±0,24SD)	0,05(±0,016SD)	0,33(±0,09SD)

Table 1: Mean number (SD) of alleles together (Ar) with observed (Ho) and expected (Hs) heterozygosities, and FIS values (level of significance after Bonferroni correction) for each populations by type habitats.

Article 3. Dynamics of fasciolosis between and within and domestic animals and wild hosts.

Sabourin, E., Lounnas, M., Alda, P., Vázquez, A., Mulero, S ., Carron, E ., Vittecoq,M. Hurtrez-Boussès, S

Article en preparation

Dynamics of fasciolosis between and within and domestic animals and wild hosts.

Emeline Sabourin [1, 2], Manon lounnas[2], Pilar Alda[2, 3], Antonio Vázquez [2 ,4], Stephen Mulero[2 ,6] ,Éric Carron[2] , Marion Vittecoq[1], Sylvie Hurtrez-Boussès [2, 5],

[1] Institut de recherche de la Tour du Valat, Arles, France.

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

[3] Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

[4] Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Ciudad de La Habana, Cuba.

[5] Département de Biologie-Ecologie, Faculté des Sciences, University of Montpellier, Montpellier, France.

[6] IHPE UMR 5244, University of Perpignan, Perpignan, France.

Fascioliosis due to the trematods *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* is a reemerging zoonosiswith strong impact on human health and livestock production. Fascioliosis is more than ever a worldwide problem in human and animal health due to recent events of emergence and occurrence of treatment resistance. Here we present an integrative approach using population genetics to follow the dynamics of *F. hepatica* in both its domestic and wild definitive hosts. Our study took place in a circumscribed area in Camargue, allowing us a good follow up of all organisms implicated in the parasite lifecycle. We studied *F. hepatica* dynamics in a rustic bovine breed of Camargue in which some herds are treated and some are not on one hand and in nutrias *(Myocastor coypus)* and wild boars (*Sus scrofa*) on the other hand. We found that untreated cattle appear to be healthy despite high parasitic load and 96% of prevalence for *F. hepatica*, while the prevalence observed in wildlife was non-negligible (31% for nutrias, 5% for wild boars). Genetic analyses indicate a high diversity and high gene flow between the infra-populations of the same herd. The low genetic differentiation between treated, untreated herds and wildlife also suggests regular gene exchanges between the different definitive hosts. In addition, our results suggest the possible role of the nutrias in maintaining the cycle and of the wild boar in spreading the disease. This article underlines the importance of studying a disease by taking into account all its definitive hosts. Indeed, this initial understanding of the dynamics of the parasite is a first step which appears necessary for the implementation of an efficient integrated *F. hepatica* management plan.

KEYWORDS: *Fasciola hepatica*, population genetic, treatments, resistance, wildlife fauna.

Introduction

Fasciolosis is a waterborne and foodborne disease is one of the parasitic diseases with the largest altitudinal, latitudinal and longitudinal distributions recorded so far (Mas-Coma et al. 2009; Fürst et al., 2012). It is caused by two trematodes*: Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Although *F. gigantica* is restrained to Africa and Asia, *F. hepatica* is cosmopolitan and has a very wide spectrum of intermediate and definitive hosts. This parasite has a complex cycle which involves, as the definitive host, a very wide range of domestic and wild mammals (sheep, cattle, horse, camels, nutria, rabbit etc.) including humans (Cotruvo et al., 2004). The intermediate host is a freshwater snail, mainly within the family of Lymnaeidae. Major sources of infection for definitive hosts are spring water or plants associated with water. Indeed, the metacercariae (i.e. infecting stages) can encyst on the water surface as well as on aquatic plants (Andrew, 1999). Fasciolosis is considered as a highly neglected tropical disease (REF). It is also an emergent and re- emergent disease in several countries with approximately 24 million human cases worldwide, more than 180 million people exposed to the risk of infection (Tolan, 2011) and an annual global burden of 35,000 DALYs (Torgerson, 2013). Fasciolosis is also considered to be a major veterinary problem. It is associated with annual economic losses in excess of US $3 billion in farming because it affects millions of ruminants worldwide (Cwiklinski et al., 2016). These costs are largely unquantified at a national or regional level, whilst at a farm level, it has been reported that fluke affects milk yield, carcass composition and extends time to reach slaughter weight (Charlier et al., 2014; Howell et al., 2015). Fasciolosis case numbers in domestic ruminants are currently increasing in some European countries, probably due to climate change, evolution of farming practices, animal displacements t , and the emergence of resistance to the drug of choice, triclabendazole (TCBZ) (Brockwell et al., 2014; Martínez-Valladares et al., 2013; Rojo-Vázquez et al., 2012). The impact of fasciolosis can vary according to the breed: some breeds can suffer important damages in terms of health but also in terms of production. The risk of fasciolosis can also vary depending on the age and sex of the animal. In order to prevent infection and/or detrimental effects of fasciolosis, it is essential to study the risks of transmission and the consequences of infection, taking into account hosts diversity (species, breed, sex, age) and husbandry practices, particularly the use of anthelminthics.

The analysis of the population genetic structure of parasites helps to understand their circulation among their hosts (De Meeûs et al. 2007).Over the last few years, a handful of studies have addressed the analysis of the genetic variability within and among natural populations of *F. hepatica* in domestic animals (Beesley et al., 2017; Robles-Pérez et al., 2014; Vazquez et al. 2016 ; Vázquez-Prieto et al., 2015; Vilas et al., 2012; Walker et al., 2011). Although fasciolosis is known to have a wide diversity of wild definitive hosts (e.g. rabbit, rodent or wild boar (Maqbool et al., 2002; Mas-Coma et al., 1997; Ménard et al., 2001; Mezo et al., 2013)) none of the previous studies has considered the genetic diversity of *F. hepatica* in wild hosts. Moreover, they also give very few information on hosts and on husbandry practices.

In order to have a comprehensive picture of the dynamics of fasciolosis among definitive hosts, we need to study, the genetic diversity of *F. hepatica* infecting wild and domestic species, at the same time and in the same area. With extensive cattle farming and wide wetland areas, the region of Camargue, in South of France is highly suitable to study the dynamics of fasciolosis among its different definitive hosts. In this area, fasciolosis is recognized as an essential problem in cattle (PNR Camargue, 2011). Moreover, the Camargue is strongly anthropized (notably through the management of freshwater inflows) and contacts between human populations, domestic animals and wildlife are very common. Particularly two species that are recognized in France as potential definitive hosts of *F. hepatica* are abundant and present close to cattle herds : the nutrias (Ménard et al 2001) and the wild boar (Mezo et al, 2013, Shimalov and Shimalov, 2000; Thompson et al, 2009). Some herds are treated with anthelminthics whereas other ones are never treated. .

The objective of our study is to provide a better knowledge of the epidemiology of fasciolosis on wild and domestic animals. For this purpose, we aimed to characterize the prevalence, intensity and genetic diversity of *F. hepatica* in cattle, nutria and wild boar and to assess the risks of infection as a function of host age and sex of the host. We also attempt to estimate the efficiency of treatments and the effects of fasciolosis on body condition of cattle.

Materials and Method

Study area and definitive hosts

Cattle present on the site are of the *Raço di Biou* breed also called Camargue bulls, originating from Camargue, and are reared in extensive breeding. The herds studied come from four farms, all of which graze on the estate of Tour du Valat : farm A, whose animals are not treated with anthelmintic and farm B, C and D which treat their cattle with anthelmintic once a year. Nutria and wild boars circulate on the same territory as bulls.

Sampling of F.hepatica

Adults of *F. hepatica* were collected, between 2014 and 2017 by dissection of livers of the definitive hosts. Immediately after death of the host, the liver was carefully examined and bile ducts were inspected in order to record the presence of *F. hepatica* or other parasites and to count and collect all the liver flukes. .

For cows, the parasites were sampled in the slaughterhouses of Tarascon (Bouches du Rhône, France) and Pézenas (Hérault, France). A total of 345 fresh the livers were examined. Similarly, we systematically examined livers of wild boars and nutrias killed in the Tour du Valat's. Wild boars were, shot by hunters and nutrias were trapped and then killed, in accordance with French laws and rules on hunting and trapping wild animals. A total of 110 wild boars and 45 nutrias livers were examined. Collected *F.hepatica* were immediately stored in 80% ethanol for further analyses. An infra-population corresponds to all the liver flukes of a single individual host.

For each definitive host we noted its age class (adult or juvenile) andsex (female, male or castrated male) and the area were it grazed or was killed. For cows, we noted the farm to which the belong. For the cows from the Tour du Valat herd we also recorded their body mass and their exact age and only for non-treated cattle, the body mass, age are also recorded.

Molecular analysis

For each liver fluke, a small piece of tissue from the posterior end (about $2mm^2$) was used for DNA extraction. DNA was extracted using the Chelex® DNA extraction technique modified after Caron et al. (2011) . Briefly, the portion of parasite tissuswas mixed with 2.5 µl of proteinase K (50mg/mL) (Promega, USA) and 100 µL of 5% Chelex® (BioRad USA), then vortexed and incubated overnight at 56◦C in T100TM

ThermalCycler (BioRad). Afterwards, the mixture was incubated for 10min at 95◦C and centrifuged at 10, 000×g for 5min. The supernatant was collected and stored at -20 ◦C.

DNA extract was diluted 1:10 and used for microsatellite amplification. Each parasite was genotyped with eight variable microsatellite loci (FH2, Fh5, Fh6, Fh7, Fh10, Fh12, FH25, FH40 = FH 222CBP with genBank accession numbers LN627942, LN627876, LN629193, LN635535, LN628015, LN628360, AJ508371, AJ508373 and AJ003821 respectively), according to protocols described elsewhere (Hurtrez-Boussès et al., 2004 ; Cwiklinski et al., 2015). Each locus was amplified using 1 µl of diluted DNA in a 9 µl reaction volume containing buffer 5X (Promega, Wisconsin, USA), 1.2ml 25mM MgCl2 2ml2mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) (Invitrogen/Life Technology, Massachusetts, USA), 1 µl of each primer (10 pmol) and 1 µl of 1U Taq DNA polymerase (Promega). Thermocycling was performed using a 96-well MJ-Research PTC 100 (MJ Research, California, USA) and consisted of an initial denaturation at 94 ° C for 4 min, 30 cycles at 94 ° C for 35 s, annealing temperature (55°C for Fh2, Fh5, Fh6, Fh7, Fh10 and Fh40; =, 60°C for Fh 12; = 57°C for Fh25=) for 30 s, 72 ° C for 30s and a final elongation step at 72 ° C for 10 min. Primers were labelled fluorescently to be used in an ABI-Prism 310 (Applera) automated sequencer. One ml of each PCR product was pooled together with 0.5 ml of internal size standard (GENESCAN 500 LIZ, Applera France), and diluted in Hi-Di Formamide (20 ml QSP) for automatic electrophoresis. Allele sizes were estimated using GeneMapper® v. 4.0 software (Applied Biosystems). PCR products used in previous studies (Hurtrez-Boussès et al., 2004 an,d Vazquez et al. 2016) served as references for sizing.

We tested the differences of parasite loads between classes of age and sex with a GLM analysis performed with R. 3.3.2 (R Development Core Team). In order to test the effects of liver fluke on animal health, we also tested, for cows from the Tour du Valat herd, the relationship between body mass and parasite load, after controlling for sex and age.

Genetic diversity and population differentiation

Linkage disequilibrium (LD) was tested between each pair of locus over all loci and sites. Each pair of loci was assessed for evidence of linkage disequilibrium. Null allele frequency was determined using CERVUS 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007). .

Current parameters of population genetics, such as allelic richness (Ar), observed (Ho) and expected (Hs) heterozygosities, and the 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, 2003; available from http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html) and Genodive software (version 189 2.0b23; Meirmans & Van Tienderen 2004). Bonferroni corrections were applied for multiple tests (Rice, 1984).

Identical multilocus genotypes (MLGs) were identified and the probability of observing n copies of a MLG based on random mating (Psex values) was tested using RClone (Bailleul et al., 2016). Individuals with statistically significant Psex values ($P < 0.05$) are to be considered as a result of clonal reproduction (Vilas et al., 2012). Genotypic richness (R), the measure of genetic diversity that describes the number of distinct MLGs within a population was also estimated with the method used by Beesley et al., (2017). GENEPOP 4.2.1 (Rousset, 2008) was used to produce a measure of the average number of migrants between populations (Nm) using the private allele method developed by Slatkin (1985). For this computation, parasites were grouped according to the definitive host from which they were collected.

Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; available from http://ritchardlab.stanford.edu/structure.html) was used to detect population structure. To determine the ancestry of individuals, the admixture model with default settings was chosen. This allows for an individual to have mixed ancestry. For the allele frequency model, allele frequencies were correlated amongst populations with default settings. Burn-in length was set at 200,000 and was followed by 100,000 Markov Chain Monte Carlo repeats. K was set at 1– 30 and repeated 20 times. To determine the most appropriate value for K, DK was determined using the method proposed by Evanno et al.,(2005) and calculated using Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012; available from http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvest). A matrix of Nei's genetic distances among pairs of populations (Nei, 1987) was computed with POPULATIONS 1.2.26 (Langella, 2002), and was used to generate a neighbor-joining tree in the software SplitsTree4 (Huson and Bryant, 2006).

Results

Parasite loads

Among the 345 liver examined, 183 were infected by *F. hepatica* (overall prevalence: 53%). A total of 1519 liver flukes were collected (mean intensity: 15.4 +/- 16.3 SD).

The details of prevalences and mean intensities per herd and host species are presented in Table 1.

In several case, we observed co-infection with another Digenean, *Dicrocoelium dendriticum*. Data on co-infection are also given in Table 1.

Untreated cattle

The prevalence of fasciolosis in untreated cattle is 96% with a mean number of 15 parasites per host (15.4+/- 14.9 SD).

Our results indicate that older cattle infected are more parasitized ($P<0.0001$). Concerning the sex effect, castrated males are less parasitized than females and males ($P<0.0001$). Moreover, intensities are higher in females than in the two of the categories ($P<0.0001$). Our results show also that the older cattle are the most heavy ($P<0.05$) and also that the heavier individuals are also the least parasitized ($P<0.0001$).

Treated Cattle

The prevalence of liver fluke, in the three treated cattle herds is variable. In the farms B and C, dissection of the livers revealed the absence of *F.hepatica* but the presence of D. *dendriticum* with a prevalence of 81% (9/11) from farm B and a prevalence of 100% for farm C (4/4). While for farm D, the prevalence for *F. hepatica* is 66% (10/15) with a number of parasites varying between 1 and 41 per host (mean= 16.3) and the coinfection prevalence with *Dicrocoelium dendriticum* is 25%.

Wildlife

Liver examinations showed that 5.4% (6/110) of the studied wild boars (*Sus scrofa*) were parasitized by *F. hepatica* with parasite burdens ranging from 2 to 11 flukes (mean =6.6), for nutria, 31% (14/45) were parasitized, the number of parasite varying between

2 and 49 (mean= 3.2). The presence of *D. dendriticum* has also been detected with a prevalence of 11 % for wild boars and 50 % for nutria.

Population genetics analyses

A total of 1519 parasites were genotyped from untreated cattle (1313) a treated cattle (67) and from wild boar (20) and from Nutria (119).

Mean number of alleles, observed (Ho) and expected heterozygosity (Hs) and F_{IS} values per population are given in Table 2. We observed non-significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium in the four definitive hosts. F_{IS} across all loci and parasites was 0.0011, which was not significantly different from zero (95% CI: -0.009, 0.013). Loci Fh2, Fh5 and Fh7 showed significant deviation from Hardy Weinberg equilibrium; however the F_{IS} value at these loci was low so the deviation was considered minor.

Untreated herd

The liver fluke populations we studied are at Hardy Weinberg equilibrium with an average non-significant F_{IS} of 0.027; ± 0.07 SD, associated with a very low self-fertilization rate of 0.035 ± 0.071 SD, and a high allelic polymorphism (4 to 25 alleles per locus).

Treated herd

For the farm D parasites, the liver fluke are also mainly cross fertilizing with a F_{IS}s of 0.068 ± 0,03 SD. For genetic diversity, it is significantly close to that of untreated infra-populations with an allelic richness 4.52 ± 0,09 SD. On the other hand, the parasite of treated sub-populations does not have GTLM, unlike the parasite of farm A, and they also have more private alleles : after correction for the number of individuals, the mean number of private alleles is with 1.11 for treated cattle and 0.86 for untreated cattle. If we calculate the genetic richness without GTLM, treated cattle have a higher genetic richness than untreated animals, with 1 for treated infra-populations and 0.95 for untreated infra-populations.

Wildlife

Hs was significantly higher in untreated cattle than wild fauna (Wilcoxon rank sum test, $P < 0.046$, $P<0.026$). Untreated cattle and treated cattle have significantly higher allelic richness than wildlife (Wilcoxon rank sum test, $P<0.001$, $P<0.01$)(Table 2).

As in the case of cattle liver fluke, infra-populations collected from wildlife are mainly cross-selfing with an average Fis of -0.082 ± 0.035 SD for wild boars and -0.269 ± 0.101 for nutrias SD (Table 1). Generally, wildlife parasites with the same MLG were present within the same animal with a maximum of 3 clonal parasites reported in one wild boars. Clonal parasites were not found to be shared by cattle, nutria and wild boars

Genetic differentiation:

Comparison Intra-lots:

Furthermore, (F_{ST} = 0.026; ± 0.03 SD). All infra-population pairs was significantly differentiated (F_{ST} = 0.026; ± 0.03 SD), except for three infra-populations (Bonferroni-adjusted probability: 0.034). This value also indicates a significant gene flow between populations. We decide to remove these 3 populations and group the others populations into a single host population.

A total of 36 parasite genotypes were represented more than once among a total of 765 complete multi-locus genotypes. Repeated MLGs were found to be shared between individuals in cattle of farm A, and 30 same MLGs were present within the same animal. In order to determine whether those MLGs that occurred more than once in an animal represented different reproductive events or were from the same clonal lineage, Psex values were calculated. However, psex values for all groups of parasites with the same MLG were statistically significant at n =2 (psex < 0.05) suggesting that they are the product of clonal reproduction. All the Psex values for all parasite with the same MLG were highly significant at n = 2 and overall ranged from 2.7 10-31 to 9.8 10-7 in parasite suggesting that MLGs represent parasites arising from clonal lineages.

Comparison between untreated and treated cattle

Both treated and untreated cattle share a number of common alleles with wildlife but they don’t share genotypes. Private (unique) alleles were also identified for each host

species, with 14%, 18%, 12% and 11% of all alleles unique to untreated cattle, treated cattle, nutria and wild boars respectively.

Comparison between domestic cattle and wild host

Between the definitive host, population host was significant differentiated. There was a low structuration (Table 3). The mean likelihood results from Structure (Pritchard et al., 2000) did not reach an asymptote which would be expected if the population was structured. In addition the majority of DK values were low, indicating a single population with no marked structure. However, we still find a K=3, which groups, in an untreated cattle cluster, another treated cattle and the last cluster the wildlife together with nutrias and wild boars. This results confirms the F_{ST} values by host population pair. Nm (the effective number of migrants) can be used to give an indirect estimate of gene flow. Parasites were grouped based on the definitive host from which they were collected, giving a mean sample size of 18.99. Nm across all loci was 7.2, and since this means the number of migrants per generation into the population is greater than 2, it is indicative of high gene flow (Slatkin, 1985). Similarly, when parasites from untreated cattle and treated cattle, nutria and were assessed separately, Nm values were 10.6, 3.5, 0.8 and 0.285, respectively.

Discussion

Dynamic of parasite in an untreated herd.

We found a prevalence in fasciolosis of 96% (N= 160) in the farm without anthelminthic treatment. This value is very high as compared to the prevalence of 18% previously described in Camargue (Camargue PNR 2011) and those of 12.6% to 25,2% given by Mage et al. (2002) in Central France . The infection rate we found is in agreement with other data recorded elsewhere in the world (e.g. Vazquez et al. 2016 in Cuba; see review in Dalton 1999).

In cattle, the probability of infection increases with age. This can be due to the accumulation of long-lived parasite during the lifespan of host. Besides there are indications that cattle might develop partial immunity with age (unlike e.g. sheep) (Andrew, 1999; Cawdery et al., 1977), supporting the hypothesis that immunity does not prevent re-establishment of new infection (Khan et al., 2009).

A non-significant trend suggests that individuals aged between 0 and three years had a higher parasitic load. If this trend is confirmed by larger sample sizes, it might confirm results given by Kuchai (2011). It can be associated with a so-called "naive" immune system for young individuals (i.e. who have not yet encountered the parasite). Thus, younger animals are more susceptible to infections than adults. Adult animals may acquire immunity to the parasite through frequent challenge and expel the ingested parasite before they establish infection (Dunn, 1978; Chauvin et al 2007).

We also found significant differences in parasite load between sexes : castrated males are less parasitized than females and non-castrated males. Since castrated males do not reproduce they do not allocate energy for reproduction, thus it is possible that their immune system would be more effective. Uncastrated males also graze with females and the pastures where females graze may be at higher risk of fasciolosis. Females, more often than not, are supposed to be more infected due to stress during pregnancy and parturition (Spithill et al., 1999). It has also been shown that stress can reduce the action of immunity against infection (Tao et al., 2012).

Our results show that the older the individuals are, the heavier they are, which is normal according to the growth curve. Heavier individuals are also the least parasitized. At least two hypotheses can be proposed: (i) the heaviest animals, might have a better immune system inducing a lower parasitic load. (ii) or the liver fluke have an impact negative in bodie conditions.

The observed absence of deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium indicates a predominance of cross-fertilization in all final hosts studied (Cwiklinski et al., 2015; Hurtrez-Boussès et al., 2004). When this reproductive strategy is accompanied by a significant gene flow, the result is a diverse metapopulation of *F. hepatica*. This is what we observe within the untreated herd. There is no structure between the different infra-populations (Fst close to 0). These results have already been observed in previous studies (Beesley et al., 2017; Vázquez et al., 2016). However, other studies showed a tendency towards a stronger structuring between infra-populations (Vilas et al., 2012; the diversity of these results might depend on the final host and its lifestyle. If animals do not graze in the same places, we would expect an important gene flow between populations of *F. hepatica*. . Indeed, breeding and management practices might have an impact on the structure of the parasite population (Grillo et al., 2007). Cattle from farm

(A) grazes all year round over large areas, which increases individuals' exposure to fasciolosis and promotes year-round infestation if left untreated. Indeed, the longevity of *F. hepatica* in cattle is shorter than in sheep (Durbin et al, 1952), a late defense mechanism eliminating 80% of the staves installed in the bile ducts 6 months after the infestation in cattle (Doyle, 1972). However if animals reinfest frequently, this could lead to an accumulation. In addition, there is very little clonality and very high genotypic diversity : only 36 identical multiclonal genotypes (GTLM) on a total of 655 GTLM. Repeated GTLMs are shared by several cattle from lots that do not graze in the same place. However, calves stay six months with their mother and some uncastrated males are with the females once a year.

No effect of treatment on population genetics of liver fluke

Prevalences in treated herds are highly variable: two treated herds (Farm B and C) did not harbour *F. hepatica* infection whereas, surprisingly, we detected 66% of fasciolosis in Farm B. Although it is still lower than in the untreated herd (96%), this result shows the inefficacy of the treatment in this herd. These differences in prevalence can be explained by differences between farms in herds characteristics and in husbandry practices. For instance, in farm D the herd is mainly composed of females with an average age of 13 years while in farm C, the animals are young. Moreover, in farm C, the animals graze in an area where no intermediate hosts have been detected (ES, personnal observations), so the risk of fasciolosis may be lower for herd C.

All the treated herds proved to be infected with another parasite : *D. dendriticum* (22%,80%,100%), The use of anthelmintic may favour other parasites as shown for instance with paramphistomiasis which increases after treatments againts fasciolosis (Alzieu and Dorchies, 2012)..

In treated farms, very high bottlenecks in parasite populations are expected and therefore reduced diversity, with antihelmintic-resistant parasites being favoured, would be observed (Vázquez et al., 2016). However, the genetic diversity and allelic richness in the liver fluke infra-population of the treated herd are not significantly different to that of untreated infra-population. This high diversity might be explained by low treatment selection pressure on liver fluke populations and/or by very large effective size in populations of *F. hepatica*. Indeed, in the farm D, the animals are treated once a

year and never live in stable. They can therefore reinfect a few weeks after treatment, as high-risk outbreaks are still present. On the other hand, the infra populations of treated bulls do not have multiclonal genotypes unlike the untreated infra-populations and they also have more private alleles. Cows of farm D have grazed for a long time in another field in Camargue before arriving on the study site; it is therefore possible that some liver fluke strains might come from elsewhere. We also observed a slight genetic differentiation between treated and untreated populations with significant Fst. There is a weak structuring with possible exchanges. For the creation of the Farm A farm, animals from Farm D were sold at Farm A, In addition, the herds from Farm A graze a few km from the cows of Farm D, and it is possible that wildlife participates in the exchange of parasites between the two farms.

Gene flow exists in *F. hepatica* populations between cattle and wildlife

In our study site, we found a prevalence of 24% in nutria and 3% in wild boars. In comparison, in the Western France (Loire Atlantique), Ménard et al. (2001) found 8.7% of nutria infected in the whole study area and 40.1% in farms where fasciolosis is present on domestic animals. Concerning the wild boar, Mezo et al. (2013) recorded a prevalence of 11.2% in Galicia (Spain). Although the intensities were low (1-14 flukes), these authors showed the possibility of shedding *F. hepatica* eggs giving rise to viable and infective miracidia and suggested a possible role of wild boar as secondary reservoir of fasciolosis. Two hypotheses could explain the low prevalence among wild boars in the Camargue (i) wild boars would avoid infectious outbreaks where cattle are found. Indeed,wild boars may not drink or feed in the same places as cows.(ii) wild boars would be less competent for liver fluke than other host. When comparing genetic diversity and allelic richness between wild and domestic animals, we found that the liver flukes of treated and untreated cows have a greater allelic richness than the liver flukes of wild animals. Genetic diversity is also higher in the liver flukes of untreated cows as compared to wildlife liver flukes. In addition, a large number of multiclonal genotypes were found in wildlife, but no clonal wildlife genotypes are found in domestic animals and inversely. Our results also indicate a weak genetic structure between wild and domestic animals. However, no structure have been detected between the liver flukes of wild boars and nutria. The lifestyle differs between wildlife and domestic animals, which could explain these results. Nutria are very territorial and have

a rather limited life expectancy (2 to 3 years). They do not move very far from their burrows (Carter and Leonard, 2002) which limits their dispersal capacity. It has already been shown that nutria may have a more important epidemiological role (Ménard et al. 2001) in fasciolosis than other wild vertebrates such as wild rabbits. , They are more often in habitats close to water, thus being able to spread liver fluke eggs near the habitats of intermediate hosts. The nutria is a very opportunistic species; its presence has been observed in a wide variety of wet biotopes. For wild boars, the prevalence is very low compared to that of nutria. They generally live on a territory of more than 100 hectares (Boitani et al., 1994) and they have a greater longevity than nutria (up to 9 years in the Camargue). In view of these results, it is possible that cattle are the main hosts of the liver fluke in the Camargue. For nutria, it would seem that it could play an important role in maintaining the cycle in the pastures when the cattle are absent. While for wild boars, it might have a role in the dispersal of intermediate hosts (Vanschoenwinkel et al., 2011; Waterkeyn et al., 2010), but also of parasite eggs thanks to its ability to travel long distances (Boitani et al., 1994).

Finally, this study highlights the importance of studying a disease by taking into account the diversity of its definitive hosts. Indeed, it gives a more comprehensive vision of the dynamics of the parasite. This can help to the implementation of an efficient integrated management program of control. For instance, several studies on schistosomiasis and other neglected tropical diseases have shown that the application of an integrated, adapted and sustainable pest management program is the most effective solution for disease control (Sabourin et al., 2018). First, such an approach is important to have a wide vision of the impact of parasites on cattle health in farms. Indeed, this impact can differ between species, breed or the farm management. In our case study, e the the Raço di Biou breed, despite its high infection rate observed, does not seem to harbour high damages in terms of longevity or meat production. Second, the prevalence of fasciolosis can be influenced by herd density, feeding but also the grazing management. All these parameters have to be considered in order to prevent the disease. For example, control might be efficient by limiting access to high-risk pastures, or by favouring hardy breeds, such as *Raço di Biou*, that have co-evolved with their parasites. Third, surveillance of individuals at risk is important to be able to target and treat the weakest individuals and avoid systematic antihelminhtic treatments. Indeed, we showed that younger, older and female individuals are at higher risk of infection. For a better efficiency, surveys would

be completed by wildlife surveillance using coprological analyses *F. hepatica;* this would help to monitor the risks and to control contacts between wildlife and domestic hosts. Finally, coprological analyses can give an idea of the presence of other parasites that could also affect cattle health. Indeed, each individual host must face a whole host of parasitic species that challenge its immune system and can exploit the same resources within the body. In addition, in the case of parasites with complex cycles, the problem of co-infections can arise at any stage of the cycle. Therefore, addressing epidemiological risks cannot be limited to the study of a single host-parasitic system, but must focus on understanding the diversity of hosts and parasites, as well as their dynamics in a variable environment, in space and time. As an illustration in our study, we observed co-infection with *F. hepatica* and *D. dendriticum*. These two parasites colonize the same organ: the liver. A high parasite load of *F. hepatica* could prevent (or limit) the installation of *D. dendriticum* and vice versa. The paramphistomum also competes with *F. hepatica* for infection of the intermediate host (Abrous et al., 1999; Dreyfuss et al., 2005; Mage et al., 2002). As a conclusion, if we are to meet the challenge of neglected disease reemergence it is essential to implement comprehensive management plans integrating all the components of parasite dynamics and coupling a good knowledge of disease risks in each farm with prevention, surveillance and treatment programs.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to O. Pineau, the estate management team of the Tour du Valat, and T.Blanchon and E.Luna-Laurent, for their great help with parasite sampling in livers. We also acknowledge S. Hafsia and M. Boisseau for their help with molecular analyses This study was financially supported by Labex CeMeb, the Tour du Valat and the INEE CNRS through the Ecosan funding program. We gratefully acknowledge to hunting managers, hunters and farmers Mr Blanc, Mr Mailhan and Mr Bon and the directors and employees of the slaughterhouses in Pézenas and Tarascon, and more particularly, the slaughterhouse veterinarians Dr S Menassa, Dr Hamitou and Dr Guillermin who allowed us to collect liver from wild boars, nutria and cattle.

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. https://doi.org/10.1007/s004360050628

Alzieu, J.-P., Dordchies, P., 2012. Réémergence de la paramphistomose bovine\n en France : Synthèse des connaissances actuelles épidémiologiques, physiopathologiques et\n diagnostiques. Bull. l'Académie vétérinaire de\n Fr. [ISSN 0001-4192], 2007, Vol. 160, N° 2, pp. 93-99 93–100.

Andrew, S., 1999. The life cycle of fasciola hepatica, in: Dalton, J.. (Ed.), Fasciolosis. CABI pub, Wallingford, UK, pp. 1–29.

Bailleul, D., Stoeckel, S., Arnaud-Haond, S., 2016. RClone: a package to identify MultiLocus Clonal Lineages and handle clonal data sets in r. Methods Ecol. Evol. 7, 966–970. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12550

Beesley, N., Williams, D.J.L., Paterson, S., Hodgkinson, J., 2017. Fasciola hepatica demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. Int. J. Parasitol. 47, 11–20. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.007

Boitani, L., Mattei, L., Nonis, D., Corsi, F., 1994. Spatial and Activity Patterns of Wild Boars in Tuscany , Italy. J. Mammal. 75, 600–612. https://doi.org/10.2307/1382507

Brockwell, Y.M., Elliott, T.P., Anderson, G.R., Stanton, R., Spithill, T.W., Sangster, N.C., 2014. Confirmation of Fasciola hepatica resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 4, 48–54. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.11.005

Carter, J., Leonard, B.P., 2002. A Review of the Literature on the Worldwide Distribution, Spread of, and Efforts to Eradicate the Nutria (Myocastor nutrias). Wildl. Soc. Bull. 30, 162–175. https://doi.org/10.2307/3784650

Cawdery, M.J., Strickland, K.L., Conway, A., Crowe, P.J., 1977. Production effects of

liver fluke in cattle I. The effects of infection on live weight gain, feed intake and food conversion efficiency in beef cattle. Br. Vet. J. 133, 145–159. https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)34136-2

Charlier, J., Vercruysse, J., Morgan, E., Van Dijk, J., Williams, D.J.L., 2014. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of Fasciola hepatica in cattle. Parasitology 141, 326–335. https://doi.org/10.1017/S0031182013001662

Cotruvo, J.A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D.O., Craun, G.F., Fayer, R., Gannon, V.P.J. (Eds.), 2004. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes, and Control. IWA publishing.

Cwiklinski, K., Allen, K., LaCourse, J., Williams, D.J., Paterson, S., Hodgkinson, J.E., 2015. Characterisation of a novel panel of polymorphic microsatellite loci for the liver fluke, Fasciola hepatica, using a next generation sequencing approach. Infect. Genet. Evol. 32, 298–304. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.014

Cwiklinski, K., O'Neill, S.M., Donnelly, S., Dalton, J.P., 2016. A prospective view of animal and human Fasciolosis. Parasite Immunol. 38, 558–568. https://doi.org/10.1111/pim.12343

Dreyfuss, G., Vignoles, P., Rondelaud, D., 2005. Fasciola hepatica: Epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. Parasitol. Res. 95, 278–282. https://doi.org/10.1007/s00436-004-1269-3

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. Mol. Ecol. 14, 2611–2620. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Fürst, T., Duthaler, U., Sripa, B., Utzinger, J., Keiser, J., 2012. Trematode Infections. Infect. Dis. Clin. North Am. 26, 399–419. https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.008

Grillo, V., Jackson, F., Cabaret, J., Gilleard, J.S., 2007. Population genetic analysis of the ovine parasitic nematode Teladorsagia circumcincta and evidence for a cryptic species. Int. J. Parasitol. 37, 435–447. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.014

Howell, A., Baylis, M., Smith, R., Pinchbeck, G., Williams, D., 2015. Epidemiology

and impact of Fasciola hepatica exposure in high-yielding dairy herds. Prev. Vet. Med. 121, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.05.013

Hurtrez-Bousses, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guegan, J.-F., Meunier, C., Bargues, M.-D., Mas-Coma, S., Renaud, F., 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (Fasciola hepatica). Mol. Ecol. Notes 4, 689–690. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00786.x

Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol. Biol. Evol. 23, 254–267. https://doi.org/10.1093/molbev/msj030

Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol. Ecol. 16, 1099–1106. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x

Khan, M.K., Sajid, M.S., Khan, M.N., Iqbal, Z., Iqbal, M.U., 2009. Bovine fasciolosis: Prevalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. Res. Vet. Sci. 87, 70–75. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.013

KUCHAI, Kuchai, J.A., 2011. Impact of Season, Sex, Age, and Agro-Ecology on the Prevalence of Fascioliasis in Buffalos of Ladakh. Online J. Anim. Feed Res. 1, 263.

MAGE, C., BOURGNE, H., TOULLIEU, H., RONDELAUD, Daniel 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 439–447. https://doi.org/10.1051/vetres

Maqbool, A., Hayat, C.S., Akhtar, T., Hashmi, H.A., 2002. Epidemiology of fasciolosis in buffaloes under different managemental conditions. Vet. Arh. 72, 221–228.

Martínez-Valladares, M., Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Cordero-Pérez, C., Famularo, M.D.R., Fernández-Pato, N., González-Lanza, C., Castañón-Ordóñez, L., Rojo-Vázquez, F.A., 2013. Prevalence of gastrointestinal nematodes and Fasciola hepatica in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. Parasit. Vectors 6, 282. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-282

Mas-Coma, S., Rodriguez, a, Bargues, M.., Valero, M.., Coello, J.., Angles, R., 1997. Secondary Reservoir Role of Domestic Animals Other Than Sheep and Cattle in Fascioliasis Transmission in the Northern Bolivian Altiplano. Res. Rev. Parasitol. 57, 39–46.

Ménard, A., Agoulon, A., L'Hostis, M., Rondelaud, D., Collard, S., Chauvin, A., 2001. Myocastor nutrias as a reservoir host of Fasciola hepatica in France. Vet. Res. 32, 499–508. https://doi.org/10.1051/vetres:2001141

Mezo, M., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Manga-González, M.Y., Peixoto, R., Mas-Coma, S., Valero, M.A., 2013. The wild boar (Sus scrofa Linnaeus, 1758) as secondary reservoir of Fasciola hepatica in Galicia (NW Spain). Vet. Parasitol. 198, 274–283. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.009

Nei, M., 1987. Genetic distance and molecular phylogeny. Popul. Genet. Fish. Manag.

Robles-Pérez, D., García-García, P., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F. a., Martínez-Valladares, M., 2014. Analysis of genetic variability of Fasciola hepatica populations from different geographical locations by ISSR-PCR. Parasitology 142, 527–533. https://doi.org/10.1017/S003118201400153X

Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M., 2012. Update on trematode infections in sheep. Vet. Parasitol. 189, 15–38. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.029

Rousset, F., 2008. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Resour. 8, 103–106. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x

Tao, S., Monteiro, A.P.A., Thompson, I.M., Hayen, M.J., Dahl, G.E., 2012. Effect of late-gestation maternal heat stress on growth and immune function of dairy calves. J. Dairy Sci. 95, 7128–7136. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5697

Tolan, R.W., 2011. Fascioliasis Due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Infection: An Update on This 'Neglected' Neglected Tropical Disease. Lab. Med. 42, 107–116. https://doi.org/10.1309/LMLFBB8PW4SA0YJI

Torgerson, P.R., 2013. One world health: Socioeconomic burden and parasitic disease control priorities. Vet. Parasitol. 195, 223–232.

https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.004

Vanschoenwinkel, B., Waterkeyn, A., Nhiwatiwa, T., Pinceel, T., Spooren, E., Geerts, A., Clegg, B., Brendonck, L., 2011. Passive external transport of freshwater invertebrates by elephant and other mud-wallowing mammals in an African savannah habitat. Freshw. Biol. 56, 1606–1619. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02600.x

Vázquez-Prieto, S., Vilas, R., Ubeira, F.M., Paniagua, E., 2015. Temporal genetic variation of Fasciola hepatica from sheep in Galicia (NW Spain). Vet. Parasitol. 209, 268–272. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.032

Vázquez, A., Lounnas, M., Sánchez, J., Alba, A., Milesi, A., Hurtrez-Boussès, S., 2016. Genetic and infective diversity of the liver fluke Fasciola hepatica (Trematoda: Digenea) from Cuba. J. Helminthol. 90, 719–725. https://doi.org/10.1017/S0022149X15001029

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. Infect. Genet. Evol. 12, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.010

Vittecoq, M., Thomas, F., Jourdain, E., Moutou, F., Renaud, F., Gauthier-Clerc, M., 2014. Risks of emerging infectious diseases: Evolving threats in a changing area, the mediterranean basin. Transbound. Emerg. Dis. 61, 17–27. https://doi.org/10.1111/tbed.12012

Walker, S.M., Johnston, C., Hoey, E.M., Fairweather, I., Borgsteede, F., 2011. Population dynamics of the liver fluke , Fasciola hepatica : the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. Parasitology 215–223. https://doi.org/10.1017/s0031182010001149

Waterkeyn, A., Pineau, O., Grillas, P., Brendonck, L., 2010. Invertebrate dispersal by aquatic mammals: A case study with nutria Myocastor nutrias (Rodentia, Mammalia) in Southern France. Hydrobiologia 654, 267–271. https://doi.org/10.1007/s10750-010-0388-3

Nansen, P., Andersen, S., Harmer, E., & Riising, H. J. (1972). Experimental fascioliasis in the pig. *Experimental parasitology*, *31*(2), 247-254.

	F.hepatica Prevalence	*F.hepatica* Intensities	*D.dicrocoelium* Prevalence	Co-infection
Farm A	96%	15,4(14,9±SD)	76%	70%
Farm B	0	0	80%	0
Farm C	0	0	100%	0
Farm D	66%	16,3(14,7±SD)	25%	25%
Nutria	31%	3,2(3,8±SD)	50%	38%
Wild boar	5,40%	6,6(3,8±SD)	11%	0

Table 1: *F.hepatica* prevalences and intensities and *D.dicrocoelium* prevalences and coinfection for each population

F.hepatica population	Ar	Ho	Hs	Fis
Farm A	4,52 (±1)	0,72 (±0,05)	0,74 (±0,05)	0,03 (NS)
Nutria	3,11 (±0,95)	0,71 (±0,06)	0,65 (±0,13)	-0,15 (NS)
Wild boar	2,28 (±0,34)	0,67 (±0,09)	0,58 (±0,14)	-0,25 (NS)
Farm B	4,36 (±0,75)	0,71 (±0,06)	0,73 (±0,05)	0,02 (NS)

Table 2: Mean number (SD) of alleles together with observed (Ho) and expected (Hs) heterozygosities, and FIS values (level of significance after Bonferroni correction) for each *Fasciola hepatica* population.

	Farm A	Nutria	Wild Boar	Farm B
Farm A	0			
Nutria	0.0092*	0		
Wild Boars	0.0331*	0.0358	0	
Farm B	0.0101*	0.0176*	0.0418*	0

* Level of significance $P < 0.05$.

Table 3: Estimates of pairwise genetic differentiation (FST) values between populations.

Annexes

Annexe 1:

Lymnaeid snails hosts of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (Trematoda: Digenea) worldwide: a practical review

Antonio A. Vázquez[1,2], Pilar Alda[1,3], Manon Lounnas[1], Emeline Sabourin[1,4], Annia Alba[2], Jean-Pierre Pointier[5], Sylvie Hurtrez-Boussès[1,6*]

[1] MIVEGEC, University of Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

[2] Laboratory of Malacology, Institute of Tropical Medicine Pedro Kourí, Autopista Novia del Mediodía km 6, La Habana, Cuba

[3] Laboratorio de Zoología de Invertebrados I, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan No. 670, B8000ICN, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

[4] Institut de recherche de la Tour du Valat, Arles, France

[5] PSL Research University, USR 3278 CNRS–EPHE, CRIOBE Université de Perpignan, Perpignan, France

[6] Département de Biologie–Ecologie, Faculté des Sciences, Université Montpellier, Montpellier, France

Corresponding author: Sylvie Hurtrez-Boussès (sylvie.hurtrez@ird.fr)

Abstract

Fasciolosis is a snail-borne disease, causing serious public and veterinary health problems worldwide. This disease is produced by the infection with *Fasciola hepatica* or *Fasciola gigantica* through the consumption of contaminated vegetable or water by the parasite's metacercarial cysts. Both species of liver flukes are worldwide transmitted by small freshwater snails of the family Lymnaeidae. A global account on the species that are actually or may act as potential hosts of *Fasciola* spp., compiling particular research on their geographical distribution and susceptibility, is needed as a helpful tool in the understanding of fasciolosis transmission and therefore, in the control and prevention programs of the disease. We have gathered here a comprehensive review of those lymnaeid species that are known to transmit the parasites in the field or have been experimentally tested. We aim to bring forward the main risks by regions and to facilitate the understanding of worldwide transmission.

Keywords: Lymnaeidae; *Fasciola hepatica*; *Fasciola gigantica*; fasciolosis, snail transmission

Review Methodology

We searched the following databases: Scopus, PubMed, Google Scholar, JSTOR, SciELO and SpringerLink. Most common keywords used in database search were: lymnaeid snails, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, natural prevalence, experimental infection, liver fluke transmission, fasciolosis. Relevant articles, both ancient and recently available, related to the snail species reported as hosts of *Fasciola hepatica* and/or *Fasciola gigantica* were included. We used articles written in English, French and Spanish. Up to 160 references were included from all continents. References of local studies, if results were included in larger scale studies were disregarded to avoid over citing. The names of species referenced in ancient studies are cited here using the latest nomenclature available for each species after recent molecular studies.

Review Text

1. Background

One of the key aspects in the epidemiology of infectious diseases is acquiring a comprehensive view of their potential extension and their means of transmission. It is mostly complicated when a pathogen includes several organisms to complete its life cycle, becoming more difficult to manage and prevent. This is especially the case of vector-borne diseases. The understanding of these diseases goes necessarily through the knowledge of their chains of transmission and vector species or hosts. Usually, intermediate hosts and vectors are ultimately the target of control programs because they stand as the weakest link in the transmission chain. To accomplish this goal, the updated distribution and actual role of the species involved in transmission is fundamental to prevent and control vector-borne diseases.

2. Fasciolosis: a snail-borne disease

Fasciolosis is a snail-borne disease causing serious public health problems worldwide, especially in low-income nations (1). However, it remains as an unsolved subject in both developing and developed countries at veterinary level (2, 3). Additionally, fasciolosis is considered as one of the most globally spread parasitic diseases, which extends widely in which extends across a large variety of habitats found in different geographic regions (4). The disease is mostly caused by the hermaphroditic parasites *Fasciola hepatica*

Linnaeus, 1758 and *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855 (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). Fasciolosis affects around 17 million people with nearly 180 million at risk of infection worldwide (5).

However, according to the World Health Organization (WHO), fasciolosis remains a Neglected Tropical Disease (6). Furthermore, *Fasciola* species are placed in a particular group known as the "Neglected" Neglected Worms where all the main food-borne trematode infections also stand (7).

Both *Fasciola* species are capable of infecting a very wide spectrum of mammalian definitive hosts, including humans, (8) where parasites reproduce sexually producing thousands of eggs at a daily basis (see figure 1 for a detailed description of the life cycle). Noteworthy, while ruminants are commonly described as the most infected definitive hosts (for which the disease asserts the highest economic losses), several smaller mammals (rodents, lagomorphs, etc.) may have an important role as reservoirs and disseminators of the parasite in the wild (9).

Lymnaeid snails (Gastropoda: Lymnaeidae) act as the intermediate hosts of *F. hepatica* where asexual reproduction of the parasite occurs and a clonal expansion from a single infective larva increases the probability of transmission. The family Lymnaeidae Rafinesque, 1815 is believed to comprise nearly one hundred species of small aquatic and amphibious snails (10). However, about 1200 species have been described worldwide (11). Lymnaeid snails have a right coiled shell and are known to extend from tropical to temperate regions; some of them occur at very cold latitudes (12-14). In general, the great ecological plasticity of lymnaeid snails allows them to inhabit a large range of ecosystems which is actually one of the key aspects of the successful extend of fasciolosis.

The family of Lymnaeidae has been the target of several taxonomic revisions in the last two decades due to its importance in the transmission of fasciolosis (15-17). Vinarski (17) presents the Lymnaeidae divided into two subfamilies, Lymnaeinae (16 genera) and Radicinae (10 genera). Some genera are known to be best suited for a particular species of *Fasciola*, where *F. hepatica* appears to be better adapted to be transmitted by the group of *Galba* whereas *F. gigantica* is commonly related with the *Radix* group (15). However, different snail habitat preferences (*e.g.* ponds, ditches, flooded crops), rather than phylogenetic affinity, may better explain the patterns of host specificity by *Fasciola*

spp. in different regions (18). Interesting, not all lymnaeid species act as intermediate hosts of *Fasciola* spp., and among those that host the parasites, there is strong variation in the potential of transmission. Indeed, different patterns of susceptibility, host-parasite compatibility and even immunological resistance have been described in this host-parasite system (19-21).

The knowledge of which particular snail species inhabits a risk area for fasciolosis transmission can be used to trigger control campaigns or mapping risks (22). The understanding of fasciolosis transmission worldwide require a global account on the snail species that are vectors or that may act as potential hosts of *Fasciola* spp. The compilation of particular research on their geographical distribution and susceptibility, is needed as a helpful tool that may serve in the control and prevention programs of the disease. In the following sections we present a review of the global distribution of lymnaeid snails with a known role in *Fasciola* spp. transmission according to the latest systematics published for this family. We will only consider those species which have experimentally proved to be susceptible to infection or that have been described as natural vectors of the parasite in the field (see Table 1).

3. Brief overview of *Fasciola* spp. distribution

Fasciola hepatica and *F. gigantica* (also known as liver flukes), are the main etiological agents of fasciolosis worldwide (figure 2). The lack of host specificity of *F. hepatica* (*i.e.* many lymnaeid snails and mammal species act as intermediate and definitive hosts respectively) determine a major role for this species in the global burden of the disease. This species is reported in all continents except Antarctica and it is present in many oceanic islands. Contrastingly, given that *F. gigantica* is restricted to the tropical and subtropical region of Asia and Africa and it may cooccur with *F. hepatica*, it has a lesser global impact in public and veterinary health (4). In any case, fasciolosis is a serious problem in some endemic regions such as the Bolivian Altiplano, Peru, Egypt, Iran and southeast Asia where prevalences in the human populations are particularly high (4, 5). From a veterinary point of view, there are reports of *F. hepatica* infecting over 300 million bovines and nearly 250 million ovine worldwide; and together with *F. gigantica* the economic losses ascend up to 3000 million of dollars (1, 5). The localities where fasciolosis reaches the highest prevalences are known for having: (a) high infection rates

and intensities in both the human and livestock populations, (b) available surface water for lymnaeid snail populations to settle in most of the year, and (c) adequate air and water temperature for the development and survival of each parasite stage in and out of the hosts (5).

4. Lymnaeid distribution

The family of Lymnaeidae has a worldwide distribution (11) (figure 3). Although this review focuses only its role in fasciolosis transmission, it is important to note that several lymnaeid species also serve as hosts of a major number of trematode families, causing diseases in wildlife and domestic fauna as well as humans (23, 24).

4.1. Transmission in the Americas

The American lymnaeid species display a vast distribution ranging from north Canada to south of Patagonia as well as through the Caribbean Islands. However, being *F. hepatica* the only reported liver fluke, the transmission is not as thoroughly reported in every region.

4.1.1. North American Lymnaeidae

In North America, studies depicting the diversity of Lymnaeidae accumulated in the past but have not been so abundant in the last decades. In the United States, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella* were pointed as the main vectors of fasciolosis but only after a series of experimental infections trials (25). However, in Florida (USA) Kaplan et al. (26) presented *G. cubensis* as the main host for *F. hepatica* due to its broad distribution and to its ability to transmit the parasite throughout the year after presented recovered field prevalence data. Still in the USA, *Galba bulimoides* from Wisconsin was experimentally infected with successful retrieval of metacercariae (27) and *Galba modicella* from Montana was found naturally infected in a goat farm with transmission occurring between spring and summer (28). Also, in Montana, Knapp et al. (29) described the transmission of *F. hepatica* by *Hinkleyia caperata*, which is supposed to occur from the east to the west coasts of North America up north to Alberta (30, 31). Another related species, *Stagnicola palustris* has been reported infected in eastern Washington (32) with a distribution range from south Alaska to New Mexico (33). In

Canada, although fasciolosis is recognized to occur within dairy cows in Quebec (34) the lymneid species implicated are not well studied. However, Hubendick (11) admitted *Galba truncatula*, *S. palustris* and probably *Galba humilis* to reach Canada. In Mexico, *G. humilis* and *G. bulimoides* are known to transmit *F. hepatica* (35) from late summer to early winter mostly in warm and damp sites (36).

In any case, the actual distribution of the lymneid species, and particularly those able to transmit *F. hepatica*, in the northern region of North America is poorly known. An ancient species report made by Sterki (37) in eastern North America informed of 13 species of Lymnaeidae including *Lymnaea stagnalis*, *P. columella*, *G. modicella*, *G. humilis*, *Ladislavella elodes* and *Radix auricularia.* However, the systematics of this family in this region should be viewed cautiously due to the lack of molecular studies that would help to clarify the identity of the species described. Given that many lymnaeid species have a large phenotypic variability and are quite difficult to differentiate by shell morphology, the numbers might be overestimated. A more recent list made by Johnson et al. (38) on the freshwater snails from Canada and USA includes 61 species of Lymnaeidae. Among them, 21 correspond to the group of the small-shelled *Galba*. Here again, these numbers are perhaps overestimated due to possible systematic confusions in absence of molecular studies. In the arctic region, lymnaeid snails are known to occur but are related to the transmission of *Fascioloides magna* parasitizing caribou populations as it has been demonstrated by the observation of parasite stages overwintering in the snails. However, the snail species are not outlined (39). A recent study carried out by Vinarski et al. (40) suggests that the endemic lymnaeid from Greenland, former *Lymnaea vahlii* should be considered as a form of the North American *Ladislavella catascopium* which is known to transmit the liver fluke (15). In any case, transmission of *F. hepatica* in these high latitudes remains unknown.

4.2.2. Caribbean Lymnaeidae

In the Caribbean basin, the situation is much less complicated with three species occurring. In Cuba, Vázquez et al. (21) infected several populations of *G. cubensis* and *P. columella* with different isolates of *F. hepatica* and reported, according to the levels of susceptibility and compatibility, the former as the main host in the island. *Galba cubensis* is described from Cuba and has an extended distribution in the country while *P.*

columella is found only from the west to the central region (41). Field studies have reported natural prevalences in *G. cubensis* ranging from 0-11% (42) and 10-34% (43) in two different localities reported as transmission foci. In Cuba, *P. columella* might play a secondary role in the transmission (21) and has been only recently reported naturally infected by for the first time in the Caribbean region with a prevalence of 1% (44). Transmission in Cuba is therefore supposed to occur by both species with several human outbreaks and important economic losses due to high cattle infection (3). Interestingly, at least six natural populations of *P. columella* from Cuba have been found to display an active resistance against *F. hepatica* miracidia infection (20, 21). Resistant populations can be phenotypically distinguished by a different mantle pigmentation pattern consisting of a number of small well-defined spots in a belt-like shape in the center (45). These resistant populations, although frequently rare, are an interesting model to tackle fasciolosis transmission if the mechanisms of resistance are to be elucidated.

Both *G. cubensis* and *P. columella* are also described in some Lesser Antilles where transmission of *F. hepatica* had never been reported, like Martinique (47) and Guadeloupe (48). Both lymnaeid species are also reported in some other Caribbean countries such as the Dominican Republic (46). In Puerto Rico (49) and Jamaica (50),

G. cubensis is responsible for *F. hepatica* transmission. Recently, a third species, *Galba schirazensis*, has been reported in the Dominican Republic (51) but it seems that it does not act in fasciolosis transmission. There is a previous report of *Galba viator* from the Dominican Republic (52) but its identification is questionable given the lack of molecular tools at that time. The fact that it is rather the distribution range of *G. cubensis* and that both species are very difficult to separate morphologically, it would probably correspond to the latter.

4.3.3. South American Lymnaeidae

As in North America, the South American scenario becomes again raveled with a diversity of very morphologically similar species able to transmit the liver fluke. In northern South America, the genus *Galba* is probably the main responsible for transmission. Several species such as *Galba cousini*, *G. cubensis*, *G. schirazensis* and *G. truncatula* are all reported in this region and most have been found regularly infected with *F. hepatica* (53, 54). The species *G. cousini* has been found in Venezuela, Colombia

and Ecuador (55-57). Its role in the transmission in these countries seems restricted to altitudes lying between 2000 and 4000 meters (56). In the last years, *G. schirazensis* was discovered in many types of habitats from Venezuela, Colombia and Ecuador (58) and its role in the transmission of *F. hepatica* remains under discussion. In Venezuela and Colombia this snail was the only species of lymnaeid found in several active foci, and although not found infected during sampling, it is highly probable that it is responsible for the transmission of *F. hepatica*. In any case, experimental infections carried out with an isolate of *F. hepatica* and a strain of *G. schirazensis* from Colombia showed that 7 snails out 400 harbored several rediae and only 2 contained free cercariae on day 50 post-exposure (19). However, in Ecuador, a 6% natural prevalence was detected in *G. schirazensis* using molecular techniques (59). The actual role of this snail species in a sustained transmission should be confirmed with cercarial shedding and effective metacercarial infectivity. Apart from *Galba* spp., *P. columella* is also reported in Venezuela (54), Colombia (60) and Ecuador (61), and also extends down through Brazil (62, 63) and Argentina (64). In the Andean countries, particularly the Bolivian Altiplano, *G. truncatula* plays a prominent role in *F. hepatica* transmission (13, 65-67). This species may also be a key player in Chile (66) and Argentina (68). *Galba viator* is also a very important intermediate host of *F. hepatica* in the southern region of Chile and Argentina (69, 70) although current reports of natural prevalences are lacking. According to Kleiman (71), this species occurs as far south as beyond parallel 42°S in the Chubut province in the Patagonian region were a 0.67% natural prevalence of *F. hepatica* was recorded (69). There were in fact reports of natural infection in *G. viator* and *P. columella* from Argentina assessed by mean of a PCR amplifying the cytochrome *c* oxidase subunit I of *F. hepatica* (72). Other South American Lymnaeidae are *Lymnaea diaphana* and *Lymnaea rupestris*. The former species is described to serve as a host of *F. hepatica* in the southern part of the Chilean and Argentinean Patagonia (73). The report in Peru of *L. diaphana* is the result of an error of identification (Pointier and Ayaqui, *unpublished data*). The role of the second species *L. rupestris* in the transmission of *F. hepatica* is not known (74).

4.4. Transmission in Eurasia

Transmission in this region has been fairly recorded in several studies except where

climatic conditions are probably too harsh for the parasite life cycle such as in Iceland (75) and probably Siberia. However, several lymnaeid species have been reported from these regions (14, 76, 77) that could eventually act as hosts.

4.4.1. European Lymnaeidae

In Britain and Ireland, there are at least eight lymnaeid species reported by Anderson (78). However, transmission has been mainly linked to the widespread *G. truncatula* and to the local *Radix balthica* (79). In continental Europe, several species such as *Radix peregra* have a broad distribution ranging from Nordic countries to southern regions and east to Ukraine. According to Schniebs et al. (80), *R. peregra* occurs also in Turkey and the Urals. Although there is no record of this species being naturally infected with *F. hepatica*, its role as well as that of *R. balthica* as incidental host in Belgium was demonstrated by Caron et al. (12) through series of experimental infections. More recently, the field prevalence of *F. hepatica* was confirmed in *R. balthica* (0.16%) and *G. truncatula* (1.31%) from Belgium and Luxembourg using a multiplex PCR (81). Another species, *Stagnicola fuscus*, was experimentally tested with *F. hepatica* miracidia originating from France and proved to be partially refractory to infection although the snails have shed cercariae (82). According to Novobilsky et al. (83), *S. fuscus* and *S. palustris* are also potential intermediate hosts of *F. hepatica* in Sweden. Overall, transmission in the field is commonly attributed to *G. truncatula* and *Omphiscola glabra* particularly in France (84-86). Recorded prevalences for *G. truncatula* range between 4.6-33% in France and a mean of 11.4% in Spain (87), and 1.4-1.8% for French *O. glabra* (85). *Galba truncatula* has been also found naturally infected in several districts of Moscow (88) and up to 84.6% prevalence was detected in Poland (89). Although there are not many field data of prevalences on the snail populations, *G. truncatula* is supposed to be a key vector in dairy farms from south Germany and Austria (90) and natural prevalences of 7% are reported from Switzerland through real-time PCR (91). Recently, some small-scale risk mapping of *F. hepatica* in farms from Belgium have been based on the spatial distribution of *G. truncatula* (22). From central Europe, several species have been described as potential hosts such as *Catascopia terebra*, *Stagnicola corvus* and *S. fuscus* in the Czech Republic (92). Several introductions, probably through the aquarium plant trade, have occurred in the past few years and may increase the risk of transmission in some countries. Such introductions include *P. columella* in France (93) and *Austropeplea viridis, G. schirazensis* and *G. cubensis* in Spain (58, 94, 95).

4.4.2. Asian Lymnaeidae

There are several species of lymnaeid snails described or reported in northern Asia from the Urals to eastern Russia (14, 76, 77, 96-98). However, there are no significant reports on *F. hepatica* infection neither in natural nor under experimental conditions. In many other areas of Asia (particularly in the south), fasciolosis is caused by both *F. hepatica* and *F. gigantica* with some regions reporting the existence of hybrids forms of the parasite such as in South Korea and Vietnam (99, 100).

As in many other regions where it has been introduced, *G. truncatula* is held responsible for transmission of *F. hepatica* in some areas in Iran together with *L. stagnalis* (101). Also, from southwest Asia, transmission of *F. gigantica* is generally linked to the presence of *Radix natalensis* (syn. *Lymnaea arabica*) and *S. palustris* in Saudi Arabia (102, 103), and *Radix gedrosiana* in Iran (104).

Southeast Asia is known to be heavily hit with both species of *Fasciola.* In Thailand at least three species of lymnaeid snails have been recorded infected with *F. gigantica*: *Radix rubiginosa*, *Radix swinhoei* and *Galba viridis* (105). Similarly, *G. viridis*, *Radix auricularia* and *R. rubiginosa* are the main lymnaeid species recorded in Vietnam with the latter being reported infected in the field (106). Unfortunately, not all field reports from fasciolosis outbreaks define the snail species responsible for the transmission. In southwest China, for example, after an outbreak of fasciolosis the transmitting snails in the area were only identified as *Galba* spp. (107). From Japan, several lymnaeids were experimentally infected using Australian strains of *F. hepatica* by Itagaki et al. (108). Only the species *Austropeplea ollula* and *Radix auricularia* resulted infected while *G. truncatula* proved to be refractory.

4.5. Transmission in Africa

Fasciolosis in Africa may occur by either infection of *F. hepatica* or *F. gigantica*. One of the most affected regions is the Nile basin in Egypt (109). In east Africa both species are also responsible for infections in countries like Kenya, Uganda, Ethiopia and Sudan (110).

4.5.1. The African Lymnaeidae

One of the lymnaeid species with broader distribution in the continent is *R. natalensis* described from South Africa (111), usually living in steady shallow waters, and considered as a very suitable host for *F. gigantica* (18). Based on field and experimental

studies, this species has been recognized as the main responsible for transmission of *F. gigantica* in Egypt (112). However, *R. natalensis* is presumed to be also a potential host of *F. hepatica* after a successful experimental infection with French strains of this parasite (113). It has also been found infected in other countries like Benin (114), Nigeria (115), Ghana (111) and is presumed to be the main transmitter in Ethiopia (116) and Uganda (117). The distribution range reaches Tanzania and Cameroon but the transmission of either *Fasciola* spp. is not well assessed (118). In western Africa, *R. natalensis* has been pointed as the main host for *F. gigantica* transmission in Senegal (119). Outside African mainland, *R. natalensis* is also found in the island of Madagascar (120) where it is the main host of *F. gigantica* (121), and in La Réunion (122). The distribution of this species in other African countries includes Somalia and Gambia and is less common along the east and southwestern coasts (111). According to Brown (111), the similar species *R. peregra* is also found in northwest Africa (Morocco and Algeria) with a single report from Ethiopia.

Moreover, *F. hepatica* transmission in Africa does not follow the same epidemiology than that of *F. gigantica,* with different hosts and distribution. In South Africa, *F. hepatica* is known to be transmitted by *G. truncatula* which inhabits preferably ecosystems of low-flowing water like borders of irrigation channels (123). This species is also responsible for transmission in Lesotho (124) and Tunisia (125) where horses have been found infected with the parasite (126). In northeastern Algeria, natural infected *G. truncatula* have been also recorded (127). Susceptibility to Algerian strains of *F. hepatica* miracidia was experimentally tested showing that the number of obtained metacercariae did not varied regardless the origin of the parasite in that country (128). Into the west, *G. truncatula* has been also found responsible for transmission of *F. hepatica* infecting sheep in the Middle-Atlas Mountains of Morocco (129). Studies regarding the compatibility between Moroccan populations of *G. truncatula* and sympatric *F. hepatica* have been done by Belfaiza et al. (130) showing that snails may impose a bottleneck on the development of mother rediae which grows more and have a higher production of daughter rediae and cercariae. According to Rondelaud et al. (131), a prevalence of 3% has been recorded in field collected Moroccan *G. truncatula*. In the east, *G. truncatula* is known to maintain *F. hepatica* life cycle in the highlands of Ethiopia (132). Moreover, *G. truncatula* has been experimentally infected with Egyptian

strains of *F. gigantica* with a frequency of 79.8% of cercariae-shedding snails proving that it may serve as a natural host for this parasite in Egypt (133). *Galba truncatula* has also been reported from Zaire, Kenya and Tanzania (111).

Another lymnaeid host of *F. hepatica* in Africa is the invasive species *P. columella*. This species has been reported as widely distributed in South Africa (111) but its contribution to fasciolosis transmission in this country is yet to be evaluated (123). After the discovery of its introduction in South Africa in 1944, it has also been found in Mozambique, Zimbabwe, Zambia and Egypt (111). However, populations of *P. columella* might be easily mistaken with *R. natalensis* and thus ancient distribution data should be re-evaluated. More recently, Grabner et al. (134) molecularly detected the natural infection of Egyptian populations of *P. columella* with several trematodes among which *F. gigantica.*

Other lymneid species occurring in Africa are *L. stagnalis* and *S. palustris*, both recorded from Morocco and Algeria (111). Transmission of *F. hepatica* by any of these lymnaeids is supposed but not assessed. Finally, it has been recently studied the introduction of *R. rubiginosa* into South Africa which could exacerbate the transmission of *F. gigantica* in this country and whose spread might go unnoticed due to similar shell morphology with the native *R. natalensis* (135).

4.6. Transmission in Australia and the Pacific islands

Transmission of *F. hepatica* in this region have been usually linked to the native lymneid *Austropeplea tomentosa*, particularly in Australia, Tasmania and New Zealand (136, 137). The role of this species as the main host of *F. hepatica* in Australia was confirmed by Boray (138). However, in this study the author also confirms the introduction of three invasive lymnaeid species: *P. columella*, *Galba viridis* and *Radix auricularia*. Subsequent infection assays were carried out proving that both *P. columella* and *G. viridis* are highly susceptible whereas *A. tomentosa* remains the most suited host (138). Later, Molloy & Anderson (136) concluded that although the introduced species may not yet have had an important impact in fasciolosis transmission, the adaptability of *P. columella* to tropical habitats could result in the expansion of *F. hepatica* in the north. Another species was described from Tasmania by Ponder & Waterhouse (137) named as *Kutikina hispida* but transmission capacity has

yet to be assessed. Fasciolosis in mainland Australia not only affects bovines but also native marsupial hosts (139). In the Indonesian archipelago, *R. rubiginosa* has been found infected with *F. gigantica* in irrigated rice fields of West Java (140). From the Micronesia, particularly the Mariana Islands, the only lymneid species reported is *G. viridis* ranked as a native species but no transmission of *Fasciola* spp. has been described so far (141). *Galba viridis* is also known to occur in Guam, Indonesia, Papua New Guinea and Thailand (142). However, far northern in the Hawaiian archipelago the species *G. viridis* is a major intermediate host of the liver fluke *F. gigantica* (143). This species has also been experimentally infected with *F. hepatica* and cercarial shedding was successfully verified (144). Also, the invasive *P. columella* has been found in Hawaii (142). In some other Pacific islands, *P. columella* has been reported from Tahiti, Rapa, Tubuai and Rurutu, but its role in the transmission of *F. hepatica* has not been established (145).

5. Concluding remarks on Lymnaeidae – *Fasciola* spp. transmission

As illustrated in this review, although many species may actually serve as intermediate hosts of *Fasciola* spp. in the field, there are a lesser number posing major threats at both regional or world scales. These threats can be due to several factors among which we may highlight: (a) the species is largely distributed and adapted to the circulating strains of liver fluke (shows higher compatibility in terms of surviving infection and redial burden for example), (b) the species is capable of establishing itself in areas of cattle-related human activities (even very anthropized habitats), (c) the species has ecological preferences that match those of the definitive hosts (aquatic/semiaquatic, there are certain lymnaeid species which are known to be amphibian, *e.g. Galba* spp.) or (d) the species has a high invasive ability. Worldwide, the introductions of *G. truncatula* and *P. columella* may have played a key role in the spread of fasciolosis. Both species have a proved susceptibility to *F. hepatica* infection, but more important, a recognized invasive ability allowing both to succeed in new environments (67, 146). As an attempt to highlight particular species by regions, major threats may be summarized for (a) the Americas: *G. truncatula*, *G. cubensis*, *G. viator* and *P. columella*; (b) Europe: *G. truncatula* and *R. balthica*; (c) Asia (particularly the southern regions): *R. rubiginosa* and *R.*

auricularia; (d) Africa: *R. natalensis* and *G. truncatula*; and (e) Oceania: *A. tomentosa* and *G. viridis*.

Although we have reviewed only the main actors in the *Fasciola* / Lymnaeidae interplay by region, we should note that the huge number of described lymnaeid snails in ancient and recent literature may lead to an annoying scenario of who transmit who in many regions. The absence of reliable morphological traits has led to confusion regarding specific identities of lymnaeid populations worldwide. Some species cannot be accurately distinguished because their shell morphology and anatomy are very similar. Even species relatively easy to identify such as *P. columella* or *G. cousini* could have been misidentified in the past due to, for instance, lack of experience in snail identification or the status of the individuals used for the identification (juveniles, worn or broken shells). Thus, studying lymnaeid species often requires an accurate molecular tool. The species identification of fasciolid larval stages found in nature also needs to be always verified, usually by experimental infections or by molecular markers. It is therefore necessary to review in the near future all reported names using the latest molecular tools and data available to reach a more plausible scenario in which, though probably complicated enough, we can picture the world transmission of liver flukes in a more reduced and comprehensible way.

Acknowledgements

We acknowledge our numerous collaborators and students who have contributed to our studies on liver flukes and snails during the last two decades. This work has been financially supported by Ecos-Sud program A16B02, Labex CeMeb (doctoral and ERJ grants to ES, post-doctoral grant to ML), Muse (project REPAS: grant n°170544IA (n°ANR-IDEX-0006) to AAV), Tour du Valat, IPK, IRD, CNRS and University of Montpellier. We are thankful to three anonymous reviewers for their valuable comments that have helped in improving the final version of this paper.

References

1. Robinson MW, Dalton JP. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiases. Philosophical Transactions of the Royal

Society B. 2009;364:2763-76.

2. Rapsch C, Dahinden T, Heinzmann D, Torgenson PR, Braun U, Deplazes P, et al. An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free- living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland. Veterinary Parasitology. 2008;154:242-9.

3. Rojas L, Vázquez A, Domenech I, Robertson LJ. Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? Trends in Parasitology. 2010;26(1):26-34.

4. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. Advances in Parasitology. 2009;69:41-146.

5. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. International Journal for Parasitology. 2005;35:1255-78.

6. WHO. Report of the WHO expert consultation on foodborne trematode infections and taeniasis/cysticercosis. Vientiane: 2009 12-16 October 2009. Report No. WHO/HTM/NTD/PCT/2011.3.

7. WHO. The "neglected" neglected worms. Geneve: 2007. December Issue 10.

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

9. Ménard A, L'Hostis M, Leray G, Marchandeau S, Pascal M, Roudot N, et al. 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. 2000;7(2):77-82.

10. Strong EE, Gargomini O, Ponder WP, Bouchet P. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. Hydrobiologia. 2008;595:149-66.

11. Hubendick B. Recent Lymnaeidae, their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens

Handlingar. 1951;4(3):1-223.

12. Caron Y, Lasri S, Losson B. *Fasciola hepatica*: An assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. Veterinary Parasitology. 2007;149:95-103.

13. Correa AC, Escobar JS, Noya O, Velázquez LE, González-Ramírez C, Hurtrez-Boussès S, et al. Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. Infection, Genetics and Evolution. 2011;11:1978-88.

14. Vinarski MV. A new species of stagnicoline snails (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) from the extreme North of Western Siberia. Zootaxa. 2011;2817:55-8.

15. Bargues MD, Mas-Coma S. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. Journal of Helminthology. 2005;79:257-67.

16. Correa AC, Escobar JS, Durand P, David P, Jarne P, Pointier JP, et al. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. BMC Evolutionary Biology. 2010;10:381.

17. Vinarski MV. One, two, or several? How many lymnaeid genera are there? Ruthenica. 2013;23(1):41-58.

18. Lotfy WM, Brant SV, DeJong RJ, Le TH, Demiaszkiewicz A, Rajapakse RPVJ, et al. Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2008;79(2):248-55.

19. Dreyfuss G, Correa AC, Djuikwo-Teukeng FF, Novobilsky A, Höglund J, Pankrác J, et al. 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. 2015;89:720-6.

20. Gutiérrez A, Pointier JP, Fraga J, Jobet E, Modat S, Pérez RT, et al. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible

Pseudosuccinea columella snail hosts. Experimental Parasitology. 2003;105:211-8.

21. Vázquez AA, Sánchez J, Pointier JP, Théron A, Hurtrez-Boussès S. *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate snail hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. Journal of Helminthology. 2014;88(4):434-40.

22. Charlier J, Soenen K, De Roeck E, Hantson W, Ducheyne E, Van Coillie F, et al. Longitudinal study on the temporal and micro-spatial distribution of *Galba truncatula* in four farms in Belgium as a base for small-scale risk mapping of *Fasciola hepatica*. Parasites & Vectors. 2014;7(1):528.

23. Cichy A, Faltýnková A, Zbikowska E. Cercariae (Trematoda, Digenea) in European freshwater snails - a checklist of records from over one hundred years. Folia Malacologica. 2011;19(3):165-89.

24. Horák P, Mikeš L, Lichtenbergová L, Skála V, Soldánová M, Brantc SV. Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. Clinical Microbiology Reviews. 2015;28(1):165-90.

25. Cruz-Reyes A, Malek EA. Suitability of six lymnaeid snails for infection with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology. 1987;24(3-4):203-10.

26. Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR, Courtney CM. The Prevalence of *Fasciola heptltica* in its Snail Intermediate Host Determiaed by DNA Probe Assay. International Journal for Parasitology. 1997;27(12):1585-93.

27. Foreyt WJ, Todd AC. Experimental Infection of Lymnaeid Snails in Wisconsin with Miracidia of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. The Journal of Parasitology. 1978;64(6):1132-4.

28. Rognlie MC, Dimke KL, Potts RS, Knapp SE. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA- based assay. Veterinary Parasitology. 1996;65:297-305.

29. Knapp SE, Dunkel AM, Han K, Zimmerman LA. Epizootiology of fascioliasis in

Montana. Veterinary Parasitology. 1992;42:241-6.

30. Jokinen EH. The freshwater snails (Mollusca: Gastropoda) of New York state. New York: The University of the State of New York; 1992.

31. Wu SK. Colorado freshwater mollusks. Colorado: University of Colorado Museum; 1989.

32. Lang BZ. Snail and mammalian hosts for *Fasciola hepatica* in Eastern Washington. Journal of Parasitology. 1977;63:938-9.

33. Leonard AB. A Yarmouthian molluscan fauna in the midcontinent region of the United States. University of Kansas Paleontological Contributions 1950. p. 1-48.

34. Bouvry M, Rau MB. Seasonal variations in egg passage of *Fasciola hepatica* in dairy cows in Quebec. Veterinary Parasitology. 1986;22:263-73.

35. Cruz-Mendoza I, Ibarra F, Quintero MT, Naranjo E, Lecumberri J, Correa D. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in cattle and *Lymnaea* (*Fossaria*) *humilis* snails in central Mexico. Parasitology Research. 2005;95:283-6.

36. Cruz-Mendoza I, Figueroa AJ, Correa D, Ramos-Martínez E, Lecumberri-López J, Quiroz-Romero H. Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of Mexico. Veterinary Parasitology. 2004;121:87-93.

37. Sterki V. Ohio Mollusca: additions and corrections. Ohio Journal of Science. 1914;14(5):270-2.

38. Johnson PD, Bogan AE, Brown KM, Burkhead NM, Cordeiro JR, Garner JT, et al. Conservation status of freshwater gastropods of Canada and the United States. Fisheries. 2013;38(6):246-82.

39. Kutz S, Ducrocq J, Verocai G, Hoar B, Colwell D, Beckmen K, et al. Parasites in ungulates of arctic North America and Greenland: a view of contemporary diversity, ecology, and impact in a world under change. Advances in Parasitology. 2012;79:99- 252.

40. Vinarski MV, Bolotov I, Schniebs K, Nekhaev IO, Hundsdoerfer AK. Endemics or strangers? The integrative re-appraisal of taxonomy and phylogeny of the

Greenland Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda). Comptes Rendus Biologies. 2017.

41. Vázquez AA, Sánchez J, Hevia Y. Distribución y preferencia de hábitats de moluscos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en Cuba. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2009;61(3):248-53.

42. Vázquez AA, Sánchez J, Alba A, Pointier JP, Hurtrez-Boussès S. Natural prevalence in Cuban populations of the lymnaeid snail *Galba cubensis* infected with the liver fluke *Fasciola hepatica*: small values do matter. Parasitology Research. 2015;114:4205-10.

43. Alba A, Vázquez AA, Sánchez J, Fraga J, Hernández HM, Martínez E, et al. Assessment of the FasciMol-ELISA in the detection of the trematode *Fasciola hepatica* in field-collected *Galba cubensis*: a novel tool for the malacological survey of fasciolosis transmission. Parasites & Vectors. 2016;9(22).

44. Gutiérrez A, Vázquez AA, Hevia Y, Sánchez J, Correa AC, Hurtrez-Boussès S, et al. First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. Journal of Helminthology. 2011;85:109-11.

45. Gutiérrez A, Pointier JP, Yong M, Sánchez J, Théron A. Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. Parasitology Research. 2003;90:129-34.

46. Gómez J, Vargas M, Malek EA. Moluscos de agua dulce de República Dominicana. Santo Domingo, Rep. Dom.: Instituto de Investigaciones en Bilharzia; 1986.

47. Pointier JP. Invading freshwater snails and biological control in Martinique island, French West Indies. Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2001;96(Suppl.):67-74.

48. Pointier JP, David P. Biological control of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of schistosomes, by *Marisa cornuarietis* in ponds of Guadeloupe: long-term impact on the local snail fauna and aquatic flora.

Biological Control. 2004;29:81-9.

49. Bendezu P, Frame AD, frame EL, Bonilla C. Watercress cultivation sites and their relationships to fascioliasis in Puerto Rico. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. 1988;72:405-11.

50. Bundy DAP, Arambulo III PV, Grey CL. La Fasciolosis en Jamaica: aspectos epidemiológicos y económicos de una zoonosis parasitaria transmitida por caracoles. Boletín de la Organización Panamericana de la Salud. 1984;96(1):1-20.

51. Bargues MD, Artigas P, Khoubbane M, Flores R, Glöer P, Rojas-García R, et al. *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail distorting fascioliasis data: genotype, phenotype, ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. PLoS One. 2011;6(9):e24567.

52. Sodeman WA Jr, Rodrick GE, Paraense WL, Vargas M. *Biomphalaria straminea* and other planorbids in the Dominican Republic. Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1985;80(4):453-6.

53. Alda P, Lounnas M, Vázquez AA, Ayaqui R, Calvopiña M, Celi-Erazo M, et al. A new multiplex PCR assay to distinguish among three cryptic *Galba* species, intermediate hosts of *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology. 2018;251:101-5.

54. Pointier JP, Noya O, Alarcón de Noya B, Théron A. Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* in Venezuela. Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(5):790-6.

55. Pointier JP, Noya O, Amarista M, Théron A. *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae): First record for Venezuala. Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004;99.

56. Uribe N, Becerra WM, Velázquez LE. *Lymnaea cousini*, huésped de *Fasciola hepatica* en el trópico alto andino de Colombia, y sus nuevos haplotipos, confirmados con el marcador mitocondrial del gen de la citocromo oxidasa I. Biomédica. 2014;34(4):598-604.

57. Villavicencio A, Carvalho de Vasconcellos M. First report of *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2005;100(7):735-7.

58. Lounnas M, Correa AC, Alda P, David P, Dubois MP, Calvopiña M, et al. Population structure and genetic diversity in the invasive freshwater snail *Galba schirazensis* (Lymnaeidae). Canadian Journal of Zoology. 2018;96:425-35.

59. Caron Y, Celi-Erazo M, Hurtrez-Boussès S, Lounnas M, Pointier JP, Saegerman C, et al. Is *Galba schirazensis* (Mollusca, Gastropoda) an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Ecuador? Parasite. 2017;24(24):1-9.

60. Salazar L, Estrada VE, Velázquez LE. Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). Experimental Parasitology. 2006;114:77-83.

61. Paraense WL. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Ecuador (Mollusca: Basommatophora). Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004;99(4):357-62.

62. Coelho LHL, Lima WS, Guimarães MP. Sympatric and allopatric combinations of *Lymnaea columella* and *Fasciola hepatica* from southern and south-eastern Brazil. Journal of Helminthology. 2009;83:285-8.

63. Paraense WL. Lymnaea columella in northern Brazil. Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1983;78:477-82.

64. Moriena RA, Alvarez JD, Pietrokovsky S, Rubel D, Prepelitchi L, Racioppi O, et al. Presencia de *Pseudosuccinea columella* naturalmente infestada con *Fasciola hepatica* en Santo Tomé (Corrientes, Argentina). Revista Veterinaria. 2008;19(2):147-9.

65. Alarcón EP, Velázquez LE. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (Digenea: Paramphistomidae) hallado en bovinos de Rionegro, Antioquia, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2009;22:168-77.

66. Bargues MD, Artigas P, Khoubbane M, Ortiz P, Naquira C, Mas-Coma S. 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. 2012;5:174.

67. Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Boussès S, Durand P, Bargues MD, Mas-Coma S, et al. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. Molecular Ecology. 2001;10:1333-40.

68. Bargues MD, Mera y Sierra RL, Gómez HG, Artigas P, Mas-Coma S. Ribosomal DNA ITS–1 sequencing of *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) and its potential impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina. Animal Biodiversity and Conservation. 2006;29(2):191-4.

69. Kleiman F, Pietrokovsky S, Prepelitchi L, Carbajo A, Wisnivesky-Colli C. Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. Veterinary Parasitology. 2007;145:274-86.

70. Pointier JP, Cazzaniga N, González-Salas C, Gutiérrez A, Arenas J, Bargues MD, et al. Anatomical studies of sibling species within Neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006;101(4):431-5.

71. Kleiman F, Pietrokovsky S, Paraense WL, Wisinivesky-Colli C. 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. 2004;99(1):23-4.

72. Cucher MA, Carnevale S, Prepelitchi L, Labbé JH, Wisnivesky-Colli C. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. Veterinary Parasitology. 2006;137:74-82.

73. Bargues MD, Mera y Sierra RL, Artigas P, Mas-Coma S. 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. 2012;107(1):111-24.

74. Paraense WL. *Lymnaea rupestris* sp.N. from southern Brazil (Pulmonata: Lymnaeidae). Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1982;77(4):437-43.

75. Blair D. Observations and experiments on some larval trematodes of freshwater snails and fish from southern Iceland. Journal of Helminthology. 1973;47(4):409-14.

76. Vinarski MV. Three lymnaeid species (Gastropoda: Lymnaeidae) new for the Irtysh River basin (Western Siberia). The Bulletin of the Russian Far East Malacological Society. 2008;12:71-8.

77. Vinarski MV, Grebennikov ME, Shishkoedova OS. Past and present distribution of *Myxas glutinosa* (O.F. Müller, 1774) in the waterbodies of the Urals and Siberia. Journal of Limnology. 2013;72(2):336-42.

78. Anderson R. An annotated list of the non-marine Mollusca of Britain and Ireland. Journal of Conchology. 2005;38(6):607.

79. Jones R, Williams H, Dalesman S, Brophy P. Confirmation of *Galba truncatula* as an intermediate host snail for *Calicophoron daubneyi* in Great Britain, with evidence of alternative snail species hosting *Fasciola hepatica*. Parasites & Vectors. 2015;8:656.

80. Schniebs K, Glöer P, Vinarski MV, Hundsdoerfer AK. Intraspecific morphological and genetic variability in the European freshwater snail *Radix labiata* (Rossmaessler, 1835) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae). Contributions to Zoology. 2013;82(1):55-68.

81. Caron Y, Martens K, Lempereur L, Saegerman C, Losson B. New insight in lymnaeid snails (Mollusca, Gastropoda) as intermediate hosts of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Belgium and Luxembourg. Parasites & Vectors. 2014;7:66.

82. Dreyfuss G, Abrous M, Rondelaud D. The Susceptibility of *Lymnaea fuscus* to Experimental Infection with *Fasciola hepatica*. The Journal of Parasitology.

2000;86(1):158-60.

83. Novobilský A, Kašný M, Beran L, Rondelaud D, Höglund J. *Lymnaea palustris* and *Lymnaea fuscus* are potential but uncommon intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Sweden. Parasites & Vectors. 2013;6(1):251.

84. Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. Natural infections of *Omphiscola glabra* (Lymnaeidae) with *Fasciola hepatica* in central France. Parasitology Research. 2003;91:458-91.

85. Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. Parasitology Research. 2005;95:278-82.

86. Rondelaud D, Hourdin P, Vignoles P, Dreyfuss G. 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. 2005;95:305-9.

87. Rondelaud D, Belfaiza M, Vignoles P, Moncef M, Dreyfuss G. Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. Journal of Helminthology. 2009;83:245-54.

88. Villavicencio A, Gorochov V, Carvalho de Vasconcellos M. *Lymnaea truncatula* Müller, 1774 (Pulmonata: Lymnaeidae) infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea), in Moscow districts, Russian Federation. Revista de Patología Tropical. 2006;35(1):59-64.

89. Kozac M, Wędrychowicz H. The performance of a PCR assay for field studies on the prevalence of *Fasciola hepatica* infection in *Galba truncatula* intermediate host snails. Veterinary Parasitology. 2009;168(1-2):25-30.

90. Knubben-Schweizer G, Torgerson PR. Bovine fasciolosis: Control strategies based on the location of *Galba truncatula* habitats on farms. Veterinary Parasitology. 2015(208):77-83.

91. Schweizer G, Meli ML, Torgerson PR, Lutz H, Deplazes P, Braun U. Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real

time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. Veterinary Parasitology. 2007;150:164-9.

92. Beran L. A contribution to distribution of genus *Stagnicola* and *Catascopia* (Gastropoda: Lymnaeidae) in the Czech Republic. Malacologica Bohemoslovaca. 2008;7:70-3.

93. Pointier J, Coustau C, Rondelaud D, Théron A. *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. Parasitology Research. 2007;101:1389-92.

94. Schniebs K, Glöer P, Quiñonero-Salgado S, Lopez-Soriano J, Hundsdoerfer AK. The first record of *Galba cubensis* (L. Pfeiffer, 1839) (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) from open fields of Europe. Folia Malacologica. 2018;26(1):3-15.

95. Schniebs K, Glöer P, Vinarski MV, Quiñonero-Salgado S, Lopez-Soriano J, Hundsdoerfer AK. A new alien species in Europe: First record of *Austropeplea viridis* (Quoy & Gaimard, 1833) (Mollusca, Gastropoda, Lymnaeidae) in Spain. Journal of Conchology. 2017;42(5):357-70.

96. Vinarski MV, Aksenova OV, Bespalaya YV, Bolotov I, Gofarov MY, Kondakov AV. *Ladislavella tumrokensis*: The first molecular evidence of a Nearctic clade of lymnaeid snails inhabiting Eurasia. Systematics and Biodiversity. 2016.

97. Vinarski MV, Glöer P. Taxonomic notes on Euro-Siberian freshwater molluscs. 3. *Galba occulta* Jackiewicz, 1959 is a junior synonym of *Lymnaea palustris* var. *terebra* Westerlund, 1885*. Mollusca. 2008;26(2):175-85.

98. Vinarski MV, Glöer P. Taxonomic notes on Euro-Siberian snails, 4. Re-examination of *Limnaea psilia* Bourguignat 1862, with the description of *Radix parapsilia* n. sp. Archives für Molluskenkunde. 2009;138(2):123-36.

99. Agatsuma T, Arakawa Y, Iwagami M, Honzako Y, Cahyaningsih U, Kang S-Y, et al. Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. Parasitology International. 2000;49:231-8.

100. Le TH, De N van, Agatsuma T, Nguyen TGT, Nguyen QD, McManus DP, et

al. Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in Vietnam. International Journal for Parasitology. 2008;38(6):725- 30.

101. Yakhchali M, Baran AI, Malekzadeh-Viayeh R. Molecular detection of the infection with *Fasciola hepatica* in field-collected snails of *Galba truncatula* and *Lymnaea stagnalis* from West Azarbaijan, Iran. Archives of Razi Institute. 2015;70(3):195-202.

102. Dajem SMB. Molecular typing of the fresh water snail *Lymnaea arabica*, the possible intermediate host of *Fasciola hepatica*, collected from Saudi Arabia, by RAPD-PCR. Egyptian Academy Journal of Biological Sciences. 2012;4(1):173-81.

103. Lotfy WM, Alsaqabi SM. Climate change and epidemiology of human parasitoses in Saudi Arabia: A review. Journal of Coastal Life Medicine. 2016;4(7):580-8.

104. Ashrafi K, Massoud J, Holakouei K, Mahmoodi M, Joafshani MA, Valero MA, et al. Evidence suggesting that *Fasciola gigantica* might be the most prevalent causal agent of fascioliasis in northern Iran. Iranian Journal of Public Health. 2004;33(4):31-7.

105. Kaset C, Eursitthichai V, Vichasri-Grams S, Viyanant V, Grams R. Rapid identification of lymnaeid snails and their infection with *Fasciola gigantica* in Thailand. Experimental Parasitology. 2010;126:482-8.

106. Dung BT, Doanh PN, The DT, Loan HT, Losson B, Caron Y. Morphological and Molecular Characterization of Lymnaeid Snails and Their Potential Role in Transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam. Korean Journal of Parasitology. 2013;51(6):657-62.

107. Chen JX, Chen MX, Ai L, Xu XN, Jiao JM, Zhu T, et al. An outbreak of human Fascioliasis gigantica in southwest China. PLoS One. 2013;8(8):e71520.

108. Itagaki T, Fujiwara S, Mashima K, Itagaki H. Experimental infection of *Lymnaea* snails with Australian *Fasciola hepatica*. Japanese Journal of Veterinary

Science. 1988;50(5):1085-91.

109. Esteban JG, González C, Curtale F, Muñoz-Antoli C, Valero MA, Bargues MD, et al. Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis villages in the Nile Delta of Egypt. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2003;69(4):429-37.

110. Malone JB, Gommes R, Hansen J, Yilma JM, Slingenberg J, Snijders F, et al. A geographic information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa based on Food and Agriculture Organization databases. Veterinary Parasitology. 1998;78:87-101.

111. Brown DS. Freshwater snails of Africa and their medical importance. Second ed. London, UK: Taylor and Francis; 1994.

112. Dar Y, Rondelaud D, Dreyfuss G. Update of fasciolosis-transmitting snails in Egypt (review and comment). Journal of the Egyptian Society of Parasitology. 2005;35(1):477-90.

113. Dar Y, Djuikwo FF, Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. *Radix natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae), a potential intermediate host of *Fasciola hepatica* in Egypt. Parasite. 2010;17:251-6.

114. Assogba MN, Dougnon JT, Alkoiret IT, Akpo Y, Boukari M, Youssao AKI. Epidémiologie de la fasciolose bovine au Bénin et essai de lutte biologique. Livestock Research for Rural Development. 2011;23(12):248.

115. Adediran OA, Uwalaka EC. Laboratory breeding of *Lymnaea natalensis* (Krauss, 1848), intermediate host of *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1856). New York Science Journal. 2013;6(8):55-7.

116. Fromsa A, Meharent B, Mekibib B. Major trematode infections of cattle slaughtered at Jimma Municipality abattoir and the occurrence of the intermediate hosts in selected water bodies of the zone. Journal of Animal and Veterniary Advances. 2011;10(12):1592-7.

117. Howell A, Mugisha L, Davies J, LaCourse EJ, Claridge J, Williams DJL, et al.

Bovine fasciolosis at increasing altitudes: Parasitological and malacological sampling on the slopes of Mount Elgon, Uganda. Parasites & Vectors. 2012;5(1):196.

118. Stothard JR, Kristensen TK. Medical and veterinary malacology in Africa. Parasitology Today. 2000;16(3):85-6.

119. Vassiliades G. Capacité de résistance à la sécheresse de la limnée (*Limnaea natalensis*), mollusque hôte intermédiaire de *Fasciola gigantica*, au Sénégal. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 1978;31(1):57-62.

120. Stothard JR, Brémond P, Andriamaro L, Loxton NJ, Sellin B, Sellin E, et al. Molecular characterization of the freshwater snail *Lymnaea natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) on Madagascar with an observation of an unusual polymorphism in ribosomal small subunit genes. Journal of Zoology, London. 2000;252:303-15.

121. Daynes P. La distomatose à Madagascar. Rapport sur des travaux réalisés de *Fasciola gigantica*. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 1967;20(4):557-62.

122. Barré N, Isautier H, Frandsen F, Mandahl-Barth G. Inventaire des mollusques d'eau douce de la Réunion. Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaires des Pays Tropicaux. 1982;35:35-41.

123. Kock KN, Wolmarans CT, Bornman M. 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. 2003;74(4):117-22.

124. Prinsloo JF, Van Eeden JA. Population dynamics of freshwater snails in Lesotho with particular reference to *Lymnaea truncatula*, the intermediate host of *Fasciola hepatica*. Wetenskaplike Bydraes van die PU vir CHO, Reeks B: Natuurwetenskappe. 1973;72:1-60.

125. Ghouaidia J, Hammami H. Interaction between the intermediate host of

Fascioliasis in Tunisia, *Galba truncatula* and a possible competitor, *Melanoides tuberculata* (Muller, 1774): a field study. African Journal of Ecology. 2014;52(3):328-33.

126. Amor N, Farjallah S, Said K, Slimane BB. First report of *Fasciola hepatica* in *Equus caballus* host species from Tunisia based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. Turkish Journal of Veterinary Animal Science. 2011;35(5):319-24.

127. Mekroud A, Benakhla A, Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G. Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep, and the host snail (*Galba truncatula*) in north-eastern Algeria. Parasitology Research. 2004;92:502-5.

128. Mekroud A, Titi A, Benakhla A, Vignoles P, Rondelaud D. *Fasciola hepatica* : sensibilité des *Galba truncatula* du nord-est algérien à l'infestation expérimentale avec des miracidiums sympatriques. Revue de Médecine Vétérinaire. 2006;157(10):494-501.

129. Khallayoune K, Stromberg BE, Dakkak A, Malone JB. Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. International Journal for Parasitology. 1991;21(3):307-14.

130. Belfaiza M, Moncef M, Rondelaud D. *Fasciola hepatica*: an unusual case of adaptation to a Moroccan population of *Galba truncatula*. Parasitology Research. 2005;95:374-8.

131. Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. La Limnée tronquée, un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire. Limoges: 2009.

132. Goll P, Scott J. The interrelationship of *Lymnaea truncatula* and ovine fascioliasis in the Ethiopian central highlands. British Veterinary Journal. 1978;134(6):551-5.

133. Dar Y, Rondelaud D, Dreyfuss G. Cercarial shedding from *Galba truncatula* infected with *Fasciola gigantica* of distinct geographic origins. Parasitology Research. 2003;89:185-7.

134. Grabner D, Mohamed FAAM, Nachev M, Méabed EMH, Sabry AHA, Sures B. Invasion biology meets parasitology: a case study of parasite spill-back with Egyptian *Fasciola gigantica* in the invasive snail *Pseudosuccinea columella*. PLoS One. 2014;9(2):e88537.

135. Nadasan DS. The invasive potential of the freshwater snail *Radix rubiginosa* recently introduced into South Africa: PhD thesis: Univ. KwaZulu-Natal; 2011.

136. Molloy JB, Anderson GR. The distribution of *Fasciola hepatica* in Queensland, Australia, and the potential impact of introduced snail intermediate hosts. Veterinary Parasitology. 2006;137:62-6.

137. Ponder W, Waterhouse J. A new genus and species of Lymnaeidae from the lower Franklin River, South Western Tasmania, Australia. Journal of Molluscan Studies. 1997;63:441-68.

138. Boray JC. The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australia. Veterinary Parasitology. 1978;4:127-41.

139. Spratt DM, Presidente PJA. Prevalence of *Fasciola hepatica* infection in native mammals in southeastern Australia. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences. 1981;59(6):713-21.

140. Estuningsih SE, Copeman DB. Trematode larvae in *Lymnaea rubiginosa* and their definitive hosts in irrigated rice fields in West Java. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 1996;1(3):200-5.

141. Kerr A. Annotated checklist of the aquatic snails of the Mariana Islands, Micronesia. University of Guam Marine Laboratory Technical Report. 2013;147:26p.

142. Cowie RH. Invertebrate invasions on Pacific Islands and the replacement of unique native faunas: a synthesis of the land and freshwater snails. Biological Invasions. 2001;3:119-36.

143. Cowie RH. Catalog and bibliography of the nonindigenous nonmarine

snails and slugs of the Hawaiian Islands. Bishop Museum Occasional Papers. 1997;50:66p.

144. Lee CG, Cho SH, Lee CY. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology. 1995;58(4):313-8.

145. Pointier JP, Marquet G. Taxonomy and distribution of freshwater mollusks of French Polynesia. The Japanese Journal of Malacology. 1990;48:147-60.

146. Lounnas M, Correa AC, Vázquez AA, Dia A, Escobar JS, Nicot A, et al. Self-fertilization, long-distance flash invasion and biogeography shape the population structure of *Pseudosuccinea columella* at the worldwide scale. Molecular Ecology. 2017;26:887-903.

147. Brumpt E, Velazquez J, Ucros H, Brumpt L. Mission E. Brumpt et L.-Ch. Brumpt en Colombie et au Venezuela. 1.- Découverte de l'hôte intermédiaire, *Limnaea bogotensis* Pilsbry, de la grande douve, *Fasciola hepatica*, en Colombie. Annales de Parasitologie Humaine et Comparee. 1939-1940;17:563-79.

148. Velázquez LE. Synonymy between *Lymnaea bogotensis* Pilsbry, 1935 and *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae). Mémorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006;101(7):795-9.

149. Malek EA. Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in Tropical America: a manual. PAHO Scientific Publication. 1985:478.

150. Lutz A. Estudios de zoología y parasitología venezolanas. Caracas: Reimpreso, UCV; 1928.

151. Durand P, Pointier JP, Escoubeyrou K, Arenas JA, Yong M, Amarista M, et al. Occurrence of a sibling species complex within neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. Acta Tropica. 2002;83:233-40.

152. Dar Y, Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Fasciola gigantica*: the growth and larval productivity of redial generations in the snail *Lymnaea truncatula*.

Parasitology Research. 2002;88:364-7.

153. Relf V, Good B, Hanrahan JP, McCarthy E, Forbes AB, deWaal T. Temporal studies on *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* in the west of Ireland. Veterinary Parasitology. 2011;175:287-92.

154. Carvalho OS, Cardoso PCM, Lira MP, Rumi A, Roche A, Berne E, et al. 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). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004;99(5):503-7.

155. Duffy T, Kleiman F, Pietrokovsky S, Issia L, Schijman AG, Wisnivesky-Colli C. Real- time PCR strategy for rapid discrimination among main lymnaeid species from Argentina. Acta Tropica. 2009;109(1):1-4.

156. Malek EA, Cogswell FB. *Lymnaea* (*Pseudosuccinea*) *columella* in Colombia. The Nautilus. 1980;94:112-4.

157. Prepelitchi L, Kleiman F, Pietrokovsky SM, Moriena RA, Racioppi O, Alvarez J, et al. 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. 2003.

158. Pullan NB, Whitten LK. Liver fluke *Fasciola hepatica* in New Zealand, Part 1. A spreading parasite in sheep and cattle. New Zealand Veterinary Journal. 1972;20:69- 72.

159. Al-jibouri M, Al-Mayah S, Hassan H. The Factors Affecting Metacercarial Production of *Fasciola gigantica* From *Lymnaea auricularia* Snails. Journal of Basrah Researches. 2011;37(4E):9-16.

160. Bank R. Fauna Europaea project. Systematical and distributional checklist of species-group taxa of continental Mollusca of Europe. version 24. www.faunaeur.org2011.

Table 1. Summary of the main lymnaeid species host of the liver flukes worldwide with their type localities, main geographic distribution and records of infection with either *Fasciola hepatica* or *Fasciola gigantica* (EI: means that the lymnaeid species has been only experimentally infected).

Lymnaeid species	Type Locality	Main geographic range	Liver fluke	Reference
***Austropeplea tomentosa* (Pfeiffer, 1855)**	Auckland (New Zealand)	Australia	*F. hepatica*	(136)
***Galba cousini* (Jousseaume, 1887)**	Chanchu-Yacu (Ecuador)	Ecuador, Colombia, Venezuela	*F. hepatica*	(55, 147, 148)
***Galba cubensis* (Pfeiffer, 1839)**	Cuba	Cuba USA Lesser Antilles, Colombia Mexico, Uruguay, Venezuela	*F. hepatica*	(42, 43) (25) (149) (150)
***Galba humilis* (Say, 1822)**	South Carolina (USA)	Mexico	*F. hepatica*	(35)
***Galba modicella* (Say, 1825)**	Owego, New York (USA)	USA	*F. hepatica*	(28)
***Galba truncatula* (Müller, 1774)**	Thangelstedt (Germany)	Argentina, Bolivia, Chile, Peru, Venezuela Africa Ireland, Europe	*F. hepatica,* *F. gigantica*	(54, 67, 151) (152) (131, 153)
***Galba viator* (d'Orbigny, 1835)**	Río Negro (Argentina)	Argentina, Brazil, Peru, Uruguay	*F. hepatica*	(61, 69, 154)
***Galba viridis* (Quoy & Gaimard, 1832)**	Guam	Hawaii Micronesia Australia	*F. hepatica* *F. gigantica*	(143) (141) (136)
***Hinkleyia caperata* (Say, 1829)**	Indiana, USA	North America	*F. hepatica*	(29)
***Lymnaea bulimoides* (Lea, 1841)**	Oregon (USA)	USA	*F. hepatica*	(27)
***Lymnaea diaphana* (King, 1830)**	San Gregorio (Chile)	Argentina, Chile	*F. hepatica*	(73, 155)
***Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758)**	Europe	Europe, Asia	*F. hepatica*	(101)
***Myxas glutinosa* (Müller, 1774)**	Fridrichsdal (Denmark)	Urals, Siberia	*F. hepatica* (EI)	(77)
***Omphiscola glabra* (Müller, 1774)**	Fridrichsdal (Denmark)	France	*F. hepatica*	(84)
***Pseudosuccinea columella* (Say, 1817)**	near Philadelphia (USA)	Cuba, USA, Central and South America France Africa Australia, New Zealand	*F. hepatica*	(44, 156, 157) (93) (111) (136, 158)
***Radix auricularia* (Linnaeus, 1758)**	Europe	Europe, Southeast Asia	*F. gigantica*	(159)
***Radix balthica* (Linnaeus, 1758)**		Iceland, British Islands, Europe, western Siberia, Asia minor	*F. hepatica*	(12)
***Radix gedrosiana* (Annadale & Prashad, 1919)**	Afghanistan	Afganistan, Iran	*F. gigantica*	(104)

***Radix labiata* (Rossmaessler, 1835)**		Europe, Turkey, Urals	*F. hepatica* (EI)	(12, 80)
***Radix lagotis* (Schrank, 1803)**	Danube river (Germany)	Europe (Danube Basin)		(160)
***Radix luteola* (Lamark, 1822)**	Bengal (India)	Nepal	*F. gigantica*	(16)
***Radix natalensis* (Krauss, 1848)**	Port Natal, Durban (South Africa)	Africa; Saudi Arabia	*F. gigantica*	(103)
***Radix ovata* (Draparnaud, 1805)**	France	France	*F. hepatica*	(82)
***Radix peregra* (Mülller, 1774)**	Fridrichsdal (Denmark)	Central Europe	*F. hepatica* (EI)	(12)
***Radix rubiginosa* (Michelin, 1831)**		Eastern Asia, Malaysia	*F. gigantica*	(105)
***Radix swinhoei* (Adams, 1866)**		South eastern Asia, Philippines	*F. gigantica*	(105)
***Stagnicola corvus* (Gmelin, 1791)**	Thuringia (Germany)	Europe	*F. hepatica*	(92)
***Stagnicola fuscus* (Pfeiffer, 1821)**	Füred, Tihany (Hungary)	Europe	*F. hepatica*	(82, 92)
***Stagnicola palustris* (Müller, 1774)**	Oregon, USA	USA Europe	*F. hepatica*	(32) (83)

Figures Captions

Figure 1: Life cycle of *Fasciola* spp. Adult parasites live in the bile ducts of mammals where sexual reproduction takes place (1). Approximately 40,000 eggs per individual are laid daily and carried out with the host faeces (2). If temperature and humidity conditions are favourable they hatch into miracidia. These larvae must find a susceptible lymnaeid snail in less than 24h to which they are steered by means of chemotaxis and phototaxis (3). Once in the snail, the miracidium turns into a sporocyst (4) and then produces rediae (5) which, in time, can give place to other generations of daughter rediae. Inside each redia, several cercariae can be produced. These stages are part of the asexual reproduction of the parasite subjected to the compatibility with their host and can last between 30 to 80 days depending on the ecological conditions. When cercariae are mature, they leave the snail, usually producing fatal damages (6). In the water, they swim and encyst forming metacercariae in aquatic or semi-aquatic vegetation or any source of solid substratum (7). Floating metacercariae have also been reported and are a source of infection by contaminated water. Susceptible mammals may close the parasite cycle by eating vegetation with encysted metacercariae. When the parasite reaches the intestine, the juveniles excyst and migrate to the liver where they achieve the adult form. Later, they establish themselves in the bile ducts where sexual maturation takes place.

Figure 2. Worldwide transmission of fasciolosis. Map built using data gathered from different reports (Torgerson and Claxton, 1999; WHO, 2013; 2014).

Figure 3. Most common ranges of the main lymnaeid species hosts of *Fasciola* spp.

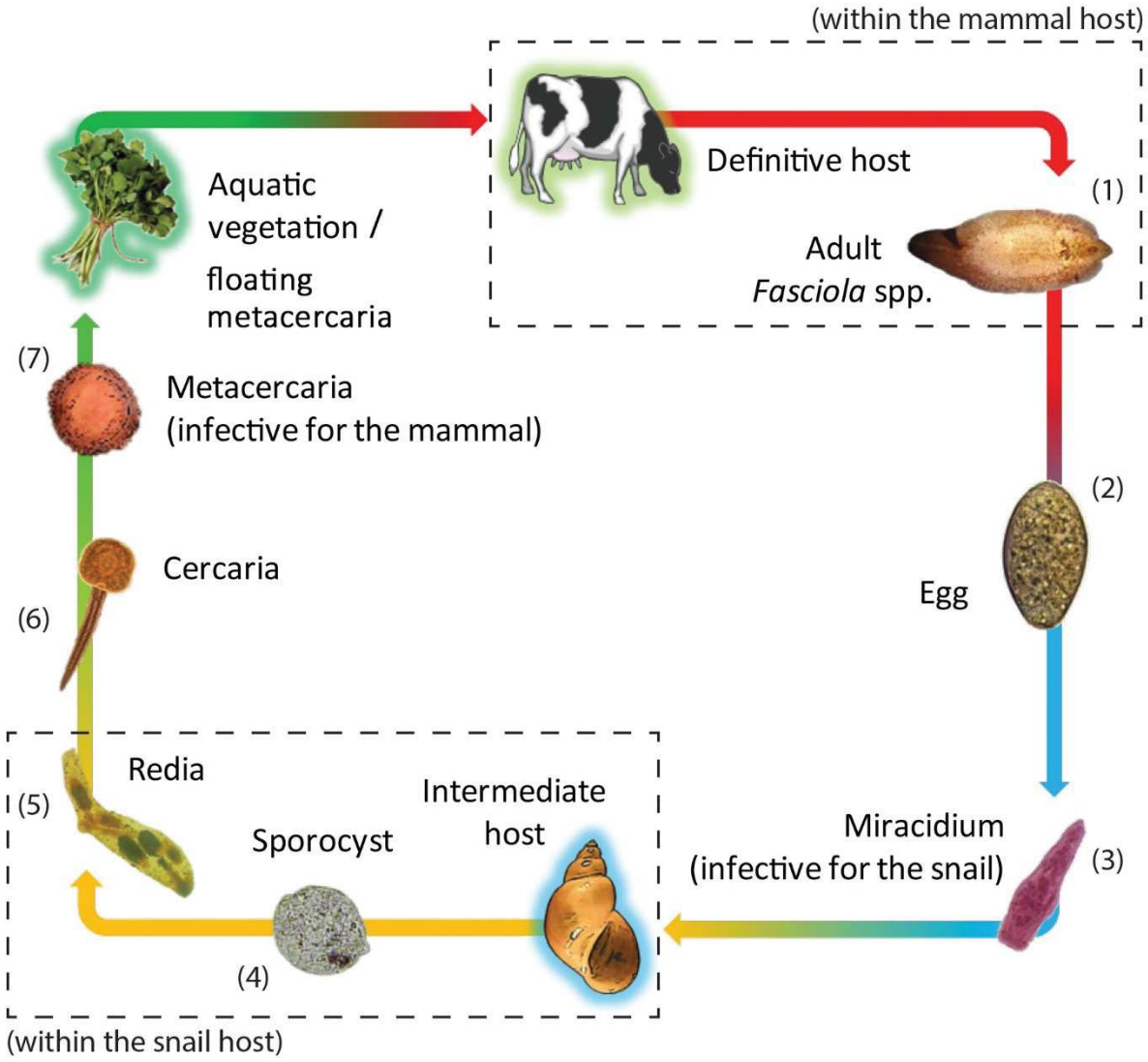

(within the mammal host)
Definitive host
(1)
Adult
Fasciola spp.
(2)
Egg
(3)
Miracidium
(infective for the snail)
Intermediate
host
Sporocyst
(4)
Redia
(5)
Cercaria
(6)
(7)
Metacercaria
(infective for the mammal)
Aquatic
vegetation /
floating
metacercaria
(within the snail host)

Figure 1

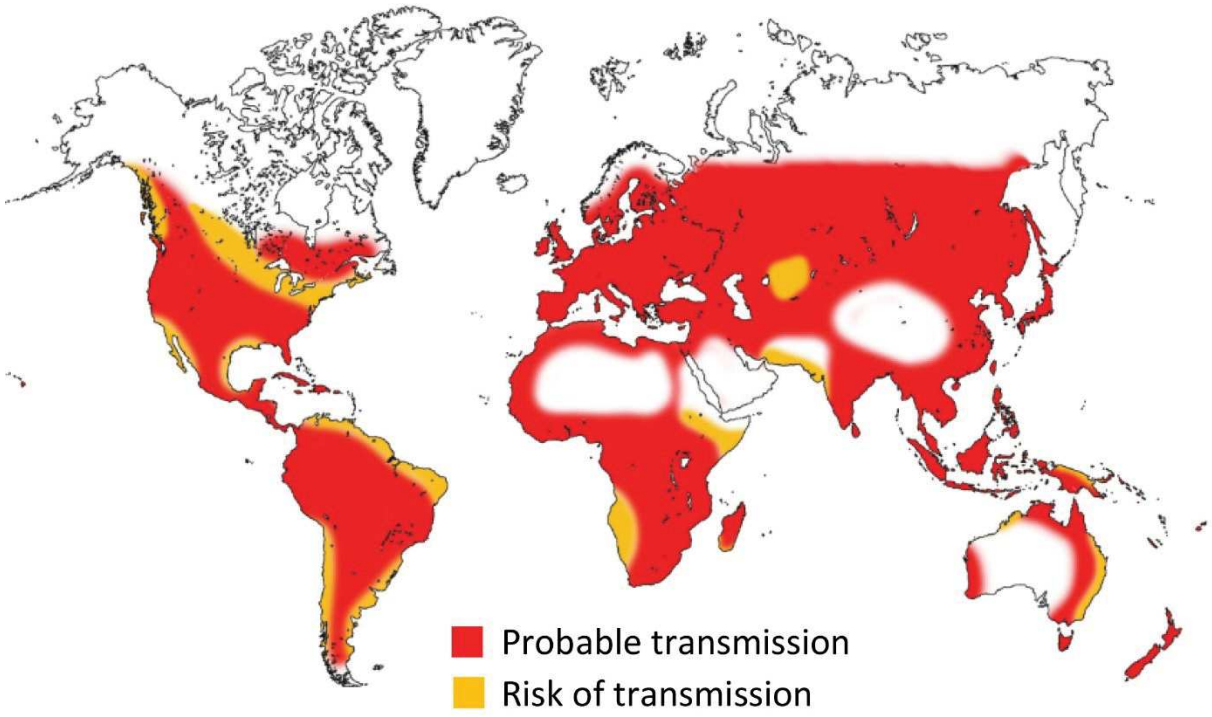


Figure 2

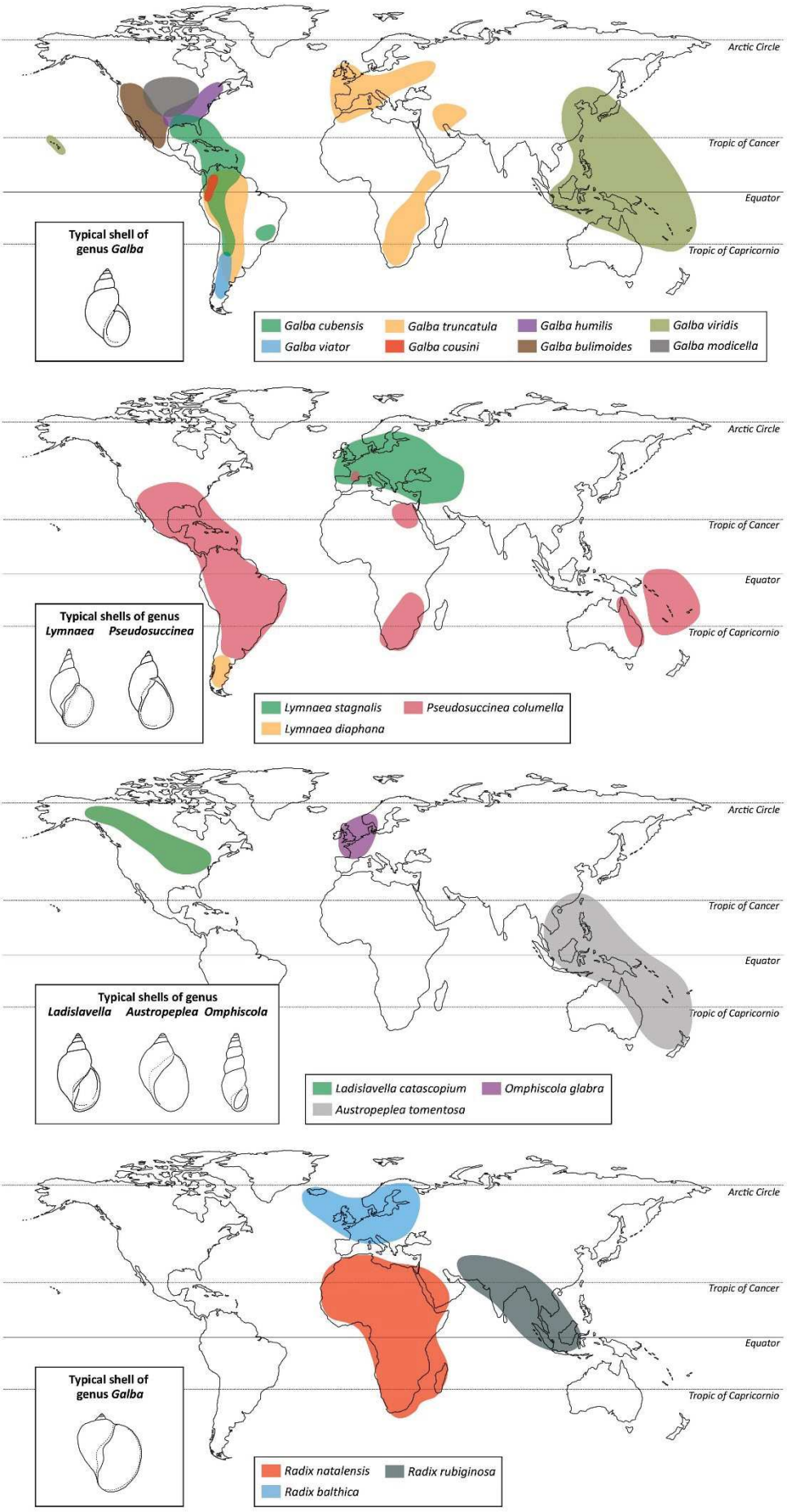

Arctic Circle
Tropic of Cancer
Equator
Tropic of Capricornio
Typical shell of genus Galba
Galba cubensis
Galba truncatula
Galba humilis
Galba viridis
Galba viator
Galba cousini
Galba bulimoides
Galba modicella
Typical shells of genus Lymnaea Pseudosuccinea
Lymnaea stagnalis
Pseudosuccinea columella
Lymnaea diaphana
Typical shells of genus Ladislavella Austropeplea Omphiscola
Ladislavella catascopium
Omphiscola glabra
Austropeplea tomentosa
Typical shell of genus Galba
Radix natalensis
Radix rubiginosa
Radix balthica

Figure 3

Annexe 2 :

Phenotype characterization of naturally-resistant and susceptible Pseudosuccinea columella populations to Fasciola hepatica from Cuba

Annia Alba[1,2], Antonio A. Vázquez[1], Jorge Sánchez[1], David Duval[2], Hilda M. Hernández[1]; Emeline Sabourin[3,4], Sylvie Hurtez-Boussés[3], Benjamin Gourbal[2*]

[1] Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba.

[2]University of Perpignan Via Domitia, Interactions Hosts Pathogens Environments UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France

[3] MIVEGEC, IRD, CNRS, Univ. Montpellier, Montpellier, France

[4] Centre de recherche de la Tour du Valat, Arles, France

*Correspondence: benjamin.gourbal@univ-perp.fr

E-mail addresses: AA: annia@ipk.sld.cu; AAV: antonivp@ipk.sld.cu; JS: jsnoda@ipk.sld.cu; DD: david.duval@univ-perp.fr; HH: Hilda@ipk.sld.cu; ES: emeline.sabourin@gmail.com; SH:sylvie.hurtrez@ird.fr; BG: benjamin.gourbal@univ-perp.fr

Abstract

Background: *Pseudosuccinea columella* is one of the main vectors of *Fasciola hepatica*, a worldwide-distributed trematode that affects humans, livestock and wildlife. Interestingly, the exclusive occurrence in Cuba of two phenotypes within this snail species; i) susceptible and ii) naturally-resistant to *F. hepatica*, offers a fascinating model for evolutionary biology, health sciences and vector control strategies. Particularly, *P. columella* resistance is mediated by a protective immune response of the host towards the parasite and has been experimentally tested using different Cuban isolates of *F. hepatica* from which no successful infection has been recorded. Here, we explore the influence of increasing *F. hepatica* doses, successive exposures and parasite origin on the infection outcomes on the stablished phenotypes of *P. columella*.

Methods: We challenged resistant and susceptible *P. columella* with *F. hepatica* using different approaches of experimental exposure: (1) increasing parasite doses (5, 15 or 30 miracidia), (2) performing serial exposures (three-times 5 miracidia dose at a three-day interval) and (3) exposing the snails to allopatric *F. hepatica* from Dominican Republic and France. Data concerning parasite prevalence and intensity was recorded up to day 25 post-exposure. Survival of exposed snails was documented.

Results: We found that resistant phenotype of *P. columella* to *F. hepatica* stands independently of the parasite dose, successive parasite exposures or parasite sources. Conversely, overall infection rate and redial burden increased in susceptible snails when infected with high miracidial doses and after serial exposures. Significant difference in parasite intensity developed in single and trickled infected-snails suggests further investigations to demonstrate immune priming in this model. The low parasite performance

of French *F. hepatica* with susceptible *P. columella* compared to Cuban (sympatric) and even Dominican isolates might be related to the "local versus foreign hypothesis" of local adaptation.

Conclusions: Here, new evidences were recorded that the resistance of *P. columella* to *F. hepatica* is not determined by a specific increase in host fitness towards particular parasite genotypes. Understanding the peculiarities of *P. columella – F. hepatica* interaction and the extent of the resistant phenotype is crucial for an effective parasite control and for developing novel alternatives to tackle fasciolosis transmission based on the potential use of this naturally-resistant snails.

Keywords: snail – trematode interaction, local adaptation, Lymnaeidae, liver fluke, experimental infections

Background

In the context of emerging and reemerging parasitic diseases, revisiting the resistance and susceptibility of hosts to parasites is of primary importance as one of the stone pillars of epidemiology and disease control. One of the models in which we can frequently stumble upon is that of snail-trematode interactions, most of which ultimately results in the transmission of several important diseases, particularly in the tropics. If we follow the Red Queen hypothesis in this model, while trematode parasites should develop a certain degree of genetic matching with its snail hosts for infection to succeed, the high selective pressure exerted by some parasite populations should favors rare host genotypes in an adaptation process [1, 2]. Thus, some host populations usually display variations in compatibility traits in accordance to the genotypes of the infecting parasites [2-4]. However, certain rare host

genotypes favored by parasite selection within a given population could be more than "locally rare" and rather than just be less susceptible genotypes result in resistant. These very rare genotypes are usually less abundant due to a fitness cost of such resistance [1]. One of the few acknowledged snail-trematode systems in which certain naturally-occurring populations of hosts are resistance to its parasite is that of *Pseudosuccinea columella* - *Fasciola hepatica* [5].

Pseudosuccinea columella is a worldwide-distributed freshwater snail that, as other members of the family Lymnaeidae, is known to act as intermediate host of the main causative agent of fasciolosis, the liver fluke *F. hepatica* [6-8].The increasing impacts of fasciolosis in public and veterinary health coupled with severe economic losses, specially where the disease is considered hyperendemic or re-emergent, determines the necessity of alleviating its burden [9]. In this sense, the existence of resistant populations of *P. columella* toward *F. hepatica* infection results very attractive for its potential use on the control of parasite transmission.

In Cuba, *P. columella* displays two different phenotypes regarding *F. hepatica* infection *i.e.* susceptibility [7] or resistance to the liver fluke [5] have been recorded in natural populations. Notably, this resistant phenotype in field-occurring *P. columella* has been described only from Cuba. For years, these populations have been experimentally tested for infection with different Cuban isolates of *F. hepatica* and have been always responded as resistant (see [4, 5, 10] for details). According to Gutiérrez et al. [5], an effective encapsulation of the parasite by hemocytes (the snail immune cells) is responsible for this naturally-resistant phenotype.

Host-parasite interactions are dynamic biological systems in which strong reciprocal selective pressures occur. In this context, various factors might affect the snail – trematode interaction. Exposure to high infective doses of the parasite and/or to trickle infections could differentially modify the parasite/host possibilities to infect or to be infected [2] and, more importantly, are likely to occur in nature, mainly in foci where parasite is prevalent and transmission is uninterrupted. In fact, experimental infections with increasing doses of miracidia or successive miracidial exposures have rendered higher infection rates, mainly in sympatric snail-trematode combinations [2, 3, 11]. In the complex scenario of host-parasite interaction, the high evolutionary potential of parasites predicts that parasites perform better on their local hosts (sympatric combinations) than on foreign (allopatric) ones [12]. In particular, digenean trematodes usually displays higher dispersal capabilities (particularly within their final host) than their snail hosts and are more likely to locally adapt to their sympatric hosts [1, 13]. However, a differential exposure of a host population to an "unknown" entity, *i.e.* allopatric parasites, might result in differential outcomes and can test for different patterns of susceptibility or even resistance. In the present work, we aim to explore the influence of these factors on resistant and susceptible *P. columella* challenged with *F. hepatica* through different experimental exposures: 1) increasing parasite doses, 2) performing serial exposures and 3) exposing the snails to foreign allopatric *F. hepatica*. Today, the world scenario of fasciolosis transmission includes the incidental introduction and worldwide spread of susceptible genotypes of *P. columella* to *F. hepatica* infection [14]. Therefore, a deeper understanding of *P. columella – F. hepatica* interaction is essential to gain new insights on parasite transmission by this vector snail while challenging the naturally-selected resistance in this species is of particular importance. The latter could help

to predict the extent at which these populations may disengage fasciolosis transmission and further on, help in finding new ways to prevent or control fasciolosis disease.

Methods

Fasciola hepatica ***isolates and laboratory-reared susceptible and resistant*** **P. columella**

We collected adults of *F. hepatica* in local abattoirs from eastern Cuba (sympatric: La Palma, in Pinar del Río province), northwestern Dominican Republic (narrow allopatric geographic scale: Dajabón province) and southern France (large allopatric geographic scale: Camargue region). Previously, the genetic structure of eight *F. hepatica* isolates from Cuba (including parasites from La Palma and other regions within its vicinity) was characterized and demonstrated the existence of high polymorphism and genetic diversity within strains and no clear structuration among isolates [15]. Flukes were collected from the liver of infected cattle and kept alive for 6h in a solution of 0.85% NaCl (saline solution) and 5% glucose (Sigma, USA) for egg laying. Eggs were preserved at 4°C in the dark and in saline solution supplemented with gentamicin (Sigma, 40 mg/mL) until use.

Snails were reared in the Laboratory of Malacology of the Institute of Tropical Medicine ‘‘Pedro Kourí’’, Cuba and derived from field populations of *P. columella* from western Cuba. We used two susceptible snail isolates: Negrines (Havana province) and Aurora (Mayabeque province) and two resistant isolates: La Coca (Havana province) and La Palma (Pinar del Río province). Snails were reared in Petri dishes growing algae, in 26°C de-chlorinated water complemented with crushed shells as carbonate supplement as previously described [16]. The snails were fed on the algae *ad libitum* and routinely changed to other Petri dishes growing algae to avoid starvation.

Experimental exposure of **P. columella** ***snails to*** **F. hepatica**

Experimental exposures of 2-weeks-old lab-reared *P. columella* from the four localities (two resistant and two susceptible) were carried out using freshly hatched miracidia, according to the methodology described by Vázquez et al. [4]. Eggs of *F. hepatica* were incubated in distilled water, in total darkness, at 28°C, for 15 days to complete maturation. Miracidia hatching was induced by direct exposure of eggs to light. For each assay, we always used 30 individuals of *P. columella* at varying conditions (see Fig. 1) as described below.

A. *Exposure to different doses of* F. hepatica *miracidia*: We exposed each *P. columella* strain separately to 5, 15 and 30 miracidia from the sympatric isolate of La Palma (Cuba) to increase the probability of exposing host populations to different parasite genotypes.

B. *Serial exposure to* F. hepatica *miracidia*: We explored the effect of trickle infections by exposing each *P. columella* strain three times to the standard dose of five miracidia [4] from the sympatric isolate of La Palma (Cuba; 3 x 5M). Each exposure was performed at a three-day interval. The selection of the re-infection interval is based on the timing at which the immune response occurs (0 to 3-4 days post-exposure with patent parasite encapsulation as early as 24h post-exposure; see [5]) which is also accompanied by possible “consumption” of defense related resources in the snail.

C. *Exposure to sympatric and allopatric* F. hepatica: We exposed each *P. columella* strain separately to the standard dose of five miracidia [4] from each allopatric *F. hepatica* isolates (Camargue, France and Dajabón, Dominican Republic). In order to save time and biological material we used the results of the 5-miracidia dose from assay A, for comparison of sympatric interactions.

In all cases, snails were individually allocated in 96-well plates and individually exposed overnight to *F. hepatica* miracidia. Each well was checked to record the penetration of all

miracidia into the snails used for each experiment. Exposed snails were maintained at 28°C and daily monitored. Day-to-day mortality was recorded and all snails found dead were carefully dissected [17] to assess infection (around day 7-10 infection was clearly patent by the presence of redia in dissected individuals). The number of redia per infected snail was counted to estimate the intensity of *F. hepatica* infection [4] per experimental group always 25 days after exposure or first exposure in case of trickle infection trial. Non-exposed snails from the same culture batch were reared in the lab under the same conditions and served as control of survival for the infection assays. No mortality was observed in these snails within the studied time frame.

Data analysis

The prevalence of *F. hepatica* in each experimental group was expressed as percentage of infected snails of all initially exposed (n = 30), confidence limits were calculated at 95% confidence level by Wilson score interval. Survival curves of exposed snails (from day 0 to day 25 post- (first) exposure) were constructed based on the number of alive snails at each time point divided by the number of exposed individuals and expressed in percentage. Data of *F. hepatica* redial counting per experimental group was checked for normality and variance homogeneity using the Shapiro-Wilk and Levene tests respectively. Factorial ANOVAs followed by the *post hoc* multiple comparison Tukey test were carried out to assess statistical significance of the effect of (1) different miracidial doses and trickle infections within host groups and (2) allopatric and sympatric (data of experimental infection with Cuban *F. hepatica* at a 5 miracidia dose) in parasitic intensities. Differences in infection rates between groups were checked by Chi Square Test (X^2) or by Fisher's Exact Test when data was 5 or less. All calculations were performed in Statistica v.12 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA 2014) and differences were always considered significant at values of $P < 0.05$.

Results

A summary of the parasitological parameters of prevalence and redial burden is presented in Table 1 and Fig. 2 for all experimental trials. Resistant *P. columella* (La Palma and La Coca) failed to develop larval stages of *F. hepatica* and no sign of infection was observed following the experimental approaches tested (Table 1). In susceptible individuals both infection rate and parasite intensity significantly increased with the miracidial dose either by single or serial exposure events (Table 1, Fig. 2A). No significant differences in parasitological parameters were observed when infecting with 15 or 30 miracidia but a slight overall decrease of snail's survival occurred in the latter, which suggests that 15 miracidia could be the optimal infective dose in our experimental conditions. Interestingly, even when no statistical significance between prevalence were recorded (Aurora – $X^2 = 0.619$, $P = 0.4314$; Negrines – $X^2 = 3.105$, $P = 0.078$), lower values of redial burden were observed in serially-delivered 15 miracidia (3 x 5M) compared to the single 15 miracidia dose (Aurora – $P = 0.0145$; Negrines – $P = 0.0326$; Fig. 2A).

On the other hand, both Cuban and Dominican isolates showed similar infection rates and redial burden when infecting the two-exposed susceptible *P. columella* at a five miracidia dose (Table 1, Fig. 2B) without decreasing survival (Fig. 3A, E). However, we found significant differences on compatibility between susceptible *P. columella* and the French *F. hepatica* isolate and this variability depended upon the snail – parasite combination (Table 1, Fig. 2B). A poor performance was recorded with French *F. hepatica* when infecting Aurora snails (low prevalence and redial burden and high host mortality; Fig. 2B; 3F) but it appears as compatible as the Cuban parasites with Negrines (Table 1, Fig. 2B). Notably, resistant groups showed higher overall survival than susceptible *P. columella* (Fig. 3). Overall, we found a peak of mortality throughout the trials occurring at 24-48h post-exposure (Fig. 3).

Discussion

Worldwide, the hermaphrodite fluke *F. hepatica* displays a high genetic diversity related to its preference for out-crossing rather than selfing as main reproductive strategy [18]. In Cuba, a recent study showed that the population genetic structure of *F. hepatica* is highly polymorphic while no clear within-island differentiation among eight different isolates was detected [15]. In this sense, higher infective doses of the parasite (either by single or re-infection events), should increase the genetic diversity to which the snails are confronted, particularly when using field-derived *F. hepatica* from Cuba. Consequently, the chance of success of parasite infection should increase and modify the effectiveness of host defenses mainly by: (i) increasing the diversity of parasite genotypes encountering each individual host, especially in highly diversified sympatric parasites such as *F. hepatica* or (ii) by increasing the probability to hijack or circumvent the effectiveness of host immune defenses [2, 19]. The latter might be particularly important in the case of resistant snails where demands of defense resources could be also expected. However, even when significantly higher infection rates were observed in susceptible *P. columella* when more than 5 miracidia were used, no *F. hepatica* infection was developed in resistant snails. Thus, it could be presumed that the means of defense involved in *P. columella* resistance is not tightly linked to genetic specificity and should be enough to protect the snails from high infective doses (single or serially-delivered) without phenotype reversion. Nevertheless, a possible survival trade-off of resistant snails should not be disregarded in the presence of large amounts of highly virulent *F. hepatica* miracidia, as was previously mentioned by Gutiérrez et al. [5]. Additionally, it could be interesting to further study the effect of resources availability and stress-inducing environmental conditions on the effectiveness of resistance in *P. columella* since they could modify the host investment to defense [20-22].

Regarding redial burden in susceptible *P. columella*, interestingly, no significant variation was observed in infected snails exposed to 15 or 30 miracidia that could be related to intraspecific competition of parasite larvae for host resources. Rondelaud et al. [23] referred that multiple miracidium infections could impact *F. hepatica* productivity in its intermediate host by limiting redial numbers on second and third generations. On the other hand, the way of delivering the infective parasites to the snails also influenced the intensity of infection (more redia in single- compared to serially-exposed snails) and could be linked to an increased ability to control parasite development on serially-exposed snails driven by boosting defenses with first exposure. Immune priming is acknowledge to occurs in invertebrates and have been reported in other snail – trematode system, *i.e*. *Biomphalaria glabrata* – *Schistosoma mansoni*, where enhanced protection of the host (ranging from decreased prevalence and parasite intensity to complete protection) may result from subsequent parasite encounters [24-26]. According to these authors, the extent of such acquired protection increases towards genetically-closed challenges and when re-exposure occurs after 10 days following primo infection. Further investigations aiming at fully demonstrate if an acquired innate immune memory process may also occur in susceptible *P. columella* – *F. hepatica* and to elucidate its features and mechanisms deserve further investigations.

In a previous study involving experimental infections with several Cuban *F. hepatica* / lymnaeid snail combination, Vázquez et al. [4] proposed the existence of polymorphism in this interaction when presented with a variety of outcomes in terms of snail survival and parasite's prevalence and intensity of infection. However, despite several (Cuban) *F. hepatica* isolates has being tested throughout the years on resistant *P. columella*, these snails have always failed to develop the parasite [4, 5, 10]. Likewise, in here, we did not

found infection in resistant *P. columella* when challenged with sympatric (Cuban) *F. hepatica* strain or allopatric (French and Dominican) isolates. This result strongly points at an effective allocation to defense that is independent of parasite origin. Interestingly, we observed a poor parasite performance when French *F. hepatica* was tested with Aurora (susceptible snails), which resulted highly infected with the Cuban isolate. These differences could rely on the existence of local adaptation in Cuba within susceptible *P. columella* - *F. hepatica* system, which has been the case in other explored snail-trematode systems (*e.g.* [2, 27]. In fact, we should expect higher genetic differences between European and Caribbean *F. hepatica* than within Caribbean strains given the high isolation by distance between each geographical isolate and the particularities of each epidemiological scenario (*e.g*. different intermediate host species, environmental conditions). Particularly, lymnaeid vectors of fasciolosis in Cuba, *Galba cubensis* and *P. columella*, also occur on the Dominican Republic, and in most of the Caribbean region [28, 29]. However, *F. hepatica* transmission in France is mainly related to *Galba truncatula* and *Omphiscola glabra* [30]. Since lower differences can be expected between allopatric parasites evolving under similar conditions e.g. the same host species (we found no significant differences between Dominican and Cuban *F. hepatica* isolates infecting susceptible *P. columella*), variations concerning vector species could be particularly important when analyzing European *F. hepatica* adaptability to Caribbean conditions. In a previous investigation, Rondelaud et al. [31] suggested that *F. hepatica* from the Americas followed a divergent evolutionary path after introduction from Europe when differential redial development and cercarial production in French *G. truncatula* infected with Argentinean and French isolates were observed.

The dynamic of *F. hepatica* infection in its snail host may explain the pattern observed in the survival curves. In the first 24-48h after miracidia penetration a serial of crucial events occurs

inside the host: (1) complete transformation of miracidia into sporocyst [32], (2) migration within the digestive tract [33] and (3) orchestration of snail defense response, whether protective or not [5]. It is during this early time that the outcome of parasite exposure is decided: either *F. hepatica* larva survive and get establish and the host became infected or no further parasite development occurs and exposed snails get free from infection. Thus, it is not surprising that a peak of mortality in *P. columella* occurred during the first 24-48h post-exposure even in individuals from resistant populations. The underlying mechanism of the resistance towards *F. hepatica* in such *P. columella* strains remains to be fully elucidated. However, we can speculate that triggering defenses against the parasite, overcoming *F. hepatica*-driven immunosuppression and mounting and regulating an effective immune response would certainly trade-off energy and resources of the host. This might result all-too-costly for some individuals, particularly if parasite's infectivity is high. In any case, and considering at both individual and population levels; resistant *P. columella* populations fail to develop the infection and to transmit *F. hepatica*.

Conclusions

Resistance of *P. columella* to *F. hepatica* stands independently of the parasite dose, successive parasite exposures or parasite source. Herein, new evidences were recorded that the natural resistance developed in *P. columella* to *F. hepatica* is not determined by a specific increase in host fitness towards particular parasite genotypes. Conversely, *F. hepatica* – susceptible *P. columella* interaction seems highly specific for infection and favored by local adaptation of parasite. Up to this point, our results endorse the potential use of resistant *P. columella* snails as an alternative for the control of parasite transmission.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AA design and performed the experiments and analysis, and drafted the manuscript. AV, DD, SH and BG participated in design of the experiments, analysis and the reviewing process. JS and ES participated in the experiments and reviewing process. HH participated in the reviewing process. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Authors' information

[1]Parasitology Division, Centre of Investigation, Diagnostic and Reference, Institute "Pedro Kourí" of Tropical Medicine, Havana, Cuba.[2] Laboratoire des Interactions Hôtes – Parasites – Environnements, Université de Perpignan, Perpignan, France.[3] MIVEGEC, Institute de Recherche pour le Développement, Université de Montpellier, Montpellier, France. [4]Centre de recherche de la Tour du Valat, Arles, France

Acknowledgements

Authors would like to thank to Mercedes Vargas for kindly donated the *F. hepatica* isolate from the Dominican Republic. Partial financial support for this investigation was provided by the subventions granted by the French Embassy in Cuba. BG was supported by ANR JCJC INVIMORY (number ANR 13-JSV7-0009) from the French National Research Agency (ANR).

References

1. Lively CM, Dybdahl MF: Parasite adaptation to locally common host genotypes. *Nature* 2000, 405:679–681.

2. Osnas EE, Lively CM: Immune response to sympatric and allopatric parasites in a snail-trematode interaction. *Frontier Zool* 2005, 2:8; doi: 10.1186/1742-9994-1182-1188.

3. Theron A, Rognon A, Gourbal B, Mitta G: Multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: a new approach of the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. *Infect Genet Evol* 2014, 26:80-88

4. Vázquez AA, Sánchez J, Pointier JP, Théron A, Hurtrez-Boussès S: *Fasciola hepatica* in Cuba: compatibility of different isolates with two intermediate intermediate hosts, *Galba cubensis* and *Pseudosuccinea columella*. *J Helminthol* 2014, 88:434-440.

5. Gutiérrez A, Pointier JP, Yong M, Sánchez J, Théron A: Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. *Parasitol Res* 2003, 90:129-134.

6. Cucher M, Carnevale S, Prepelitchi L, Labbé J, Wisnivesky-Colli C: PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet Parasitol* 2006, 137:74-82.

7. Gutiérrez A, Vázquez AA, Hevia Y, Sánchez J, Correa AC, Hurtrez-Bouseès S, Pointier JP, Théron A: First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. *J Helminthol* 2011, 85:109-111.

8. Dar Y, Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G: Role of the lymnaeid snail *Pseudosuccinea columella* in the transmission of the liver fluke *Fasciola hepatica* in Egypt. *J Helminthol* 2015, 89(6):699-706.

9. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA: Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 2009, 69:41-146.

10. Calienes AF, Fraga J, Pointier JP, Yong M, Sánchez J, Coustau C, Gutiérrez A, Théron A: Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Trop* 2004, 92:83-87.

11. Dar Y, Lounnas M, Djuikwo F, Teukeng FF, Mouzet R, Courtioux B, Hurtrez-Boussès S, Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D: Variations in local adaptation of allopatric *Fasciola hepatica* to French *Galba truncatula* in relation to parasite origin. *Parasitol Res* 2013, 112:2543–2549.

12. Kawecki T, Ebert D: Conceptual issues in local adaptation. *Ecol Lett* 2004, 7:1225-1241.

13. Gandon S: Local adaptation and host-parasite interactions. *Trends Ecol Evol* 1998, 13:214–216.

14. Lounnas M, Correa AC, Vázquez AA, Dia A, Escobar JS, Nicot A, Arenas J, Ayaqui R, Dubois MP, Gimenez T *et al*: Self-fertilization, long-distance flash invasion and biogeography shape the population structure of *Pseudosuccinea columella* at the worldwide scale. *Mol Ecol* 2017, 26(3):887–903.

15. Vázquez AA, Lounnas M, Sánchez J, Alba A, Milesi A, Hurtrez-Boussés S: Genetic and infective diversity of the common liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) from Cuba. *J Helminthol* 2016, 14:1-7.

16. Sánchez R, Perera G, Sánchez J: Cultivo de *Fossaria cubensis* (Pfeiffer) (Pulmonata: Lymnaeidae) hospedero intermediario de *Fasciola hepatica* (Linnaeus) en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1995, 47:71-73.

17. Caron Y, Rondelaud D, Rosson B: The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with emphasis in *Fasciola* sp. *Parasitol Res* 2008, 103:735-744.

18. Cwiklinsky K, Dalton JP, Dufresne PJ, La Course J, Williams DJL, Hodgkinson J, Paterson S: The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol* 2015, 16:71; doi: 10.1186/s13059-13015-10632-13052.

19. Jokela J, Schmid-Hempel P, Rigby MC: Dr. Pangloss restrained by the Red Queen – steps towards a unified defence theory. *OIKOS* 2000, 89:267 – 274.

20. Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G: The stress of *Lymnaea truncatula* just before miracidial exposure with *Fasciola hepatica* increased the prevalence of infection. *Exp Parasitol* 2001, 99(1):49-51.

21. Seppälä O, Jokela J: Maintenance of genetic variation in Immune defense of a freshwater snail: role of environmental heterogeneity. *Evolution* 2010, 64(8):2397–2407.

22. Leicht K, Jokela J, Seppälä O: An experimental heat wave changes immune defense and life history traits in a freshwater snail. *Ecol Evol* 2013, 3(15):4861–4871.

23. Rondelaud D, Belfaiza M, Vignoles P, Moncef M, Dreyfuss G: Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. *J Helminthol* 2009, 83:245-254.

24. Sire C, Rognon A, Theron A: Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitol* 1998, 117(Pt 2):117-122.

25. Portela J, Duval D, Rognon A, Galinier R, Boissier J, Coustau C, Mitta G, Théron A, Gourbal B: Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. *J Innate Immunol* 2013, 5(3):261-276.

26. Pinaud S, Portela J, Duval D, Nowacki FC, Olive MA, Allienne JF, Galinier R, Dheilly N, Kieffer-Jaquinod S, Mitta G *et al*: A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathog* 2016, 12(1):e1005361; doi:1005310.1001371/journal.ppat.1005361.

27. Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D: Local adaptation of the trematode *Fasciola hepatica* to the snail *Galba truncatula*. *Parasite* 2012, 19(3):271–275.

28. Gomez JD, Vargas M, Malek EA: Freshwater mollusks of the Dominican Republic. *Nautilus* 1986, 100(4):130-134.

29. Vázquez AA, Hevia Y, Sánchez J: Distribución y preferencia de hábitats de moluscos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2009, 61(3):248-253.

30. Correa AC, De Meeûs T, Dreyfuss G, Rondelaud D, Hurtrez-Boussès S: *Galba truncatula* and *Fasciola hepatica*: Genetic costructures and interactions with intermediate host dispersal. *Infect Genet Evol* 2017, 55:186-194.

31. Rondelaud D, Sanabria R, Vignoles P, Dreyfuss G, Romero J: *Fasciola hepatica*: variations in redial development and cercarial production in relation to the geographic origin of the parasite. *Parasite* 2013, 20:33; doi: 10.1051/parasite/2013034.

32. Andrews SJ: The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: *Fasciolosis.* Edited by Dalton JP. UK: CAB International; 1999: 1-30.

33. Magalhães KC, Jannotti-Passos LK, Caldeira RL, Aires ME, Muller G, Carvalho OS, Lenzi EL: Isolation and detection of *Fasciola hepatica* DNA in *Lymnaea viatrix* from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR. *Vet Parasitol* 2008, 152:333-338.

Figure captions and table

Fig 1. Work flow diagram of the experimental exposure approaches performed on *P. columella* resistant/susceptible – *Fasciola hepatica* model. The influence of different parasite doses (A) and successive parasite exposures (B) on *P. columella* phenotypes were assayed using sympatric (Cuban) *F. hepatica*. The effect of different parasite geographic origin is presented in (C).

Fig 2. Redial burden of *Fasciola hepatica* in two susceptible *Pseudosuccinea columella* populations using different experimental exposures approaches (factorial ANOVA results). A: exposure to different doses of 5, 15 and 30 miracidia (M) and a serial (three times) exposure to 5 miracidia of Cuban *F. hepatica* (SE - 3 x 5M); B: exposure to a dose of five miracidia of sympatric (Cuban) and allopatric *F. hepatica* isolates. Vertical bars denote 0.95 confidence intervals and different letters means differences among means after a *post hoc* Tukey test.

Fig 3. Survival curves of experimentally-exposed resistant (R) and susceptible (S) *Pseudosuccinea columella* to *Fasciola hepatica*. Snails were challenged following different approaches: increasing miracidial doses (A-C), serial exposures (SE; D) and exposure to allopatric *F. hepatica* isolates (E,F). M: miracidia.

Table 1. Prevalence (at 95% confidence interval) of *Fasciola hepatica* in resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* using different experimental exposure approaches. Resistant populations: La Coca and La Palma; susceptible populations: Aurora and Negrines; M: miracidia.

		Pseudosuccinea columella populations			
Experimental infections	**Experimental Groups**	**La Coca (n = 30)**	**La Palma (n = 30)**	**Aurora (n = 30)**	**Negrines (n = 30)**
Increasing infective dose - sympatric *F. hepatica*	5 M	0%	0%	66.7% (48.1-85.2%)	63.3% (44.4-82.2%)
	15 M	0%	0%	83.0% (66.4-92.6%)	90.0% (74.4-96.5%)
	30 M	0%	0%	93.3% (78.7-98.2%)	80.0% (62.7-90.5%)
Serial exposure - sympatric *F. hepatica*	3 x 5M	0%	0%	90.0% (74.4-96.5%)	100% (88.7-100%)
Exposure to Allopatric *F. hepatica*	Dominican Republic 5 M	0%	0%	50.0% (33.1-66.9%)	66.7% (48.8 – 80.8%)
	France 5 M	0%	0%	13.3% (4.2-29.9%)	60.0% (40.7-76.6%)

Annexe 3 :

FOCUS

Une maladie méconnue aux enjeux importants : la fasciolose

La fasciolose est une maladie causée par le parasite *Fasciola hepatica,* communément appelé la grande douve du foie. Cette maladie se transmet par la nourriture ou l'eau, les larves se fixant sur les plantes aquatiques ou à la surface de l'eau. C'est pourquoi elle est très répandue au sein des populations humaines et animales. En effet, ce parasite peut infester à l'état adulte un très grand nombre de mammifères (hommes, bovins, ovins, ragondins, sangliers, lamas…) mais il peut aussi, à l'état larvaire, infester une grande diversité de mollusques d'eau douce (Cf. figure 1). Se développant dans le foie, les adultes causent de très graves troubles digestifs et peuvent conduire à une cirrhose. Les traitements sont coûteux, pour l'Homme comme pour le bétail et des cas de résistance ont été décrits. Il s'agit donc d'une maladie reconnue comme ayant un impact en santé vétérinaire et en santé publique dans de nombreux pays.

En France, les habitudes alimentaires réduisent les risques de transmission à l'Homme mais la maladie induit des coûts importants dans les élevages. Il est donc essentiel de mieux comprendre cette maladie pour mieux la contrôler. Pour cela nous avons ciblé un territoire d'étude où le parasite est très présent et où nous pouvons avoir une bonne traçabilité des différents acteurs du cycle (parasites, mollusques et bétail). Depuis 2016, Emeline Sabourin étudie la dynamique de la fasciolose sur le domaine de la Tour du Valat dans le cadre de sa thèse.

Le parasite au sein du bétail et de la faune sauvage

Nous avons recherché les parasites adultes chez les taureaux de la manade de la Tour du Valat mais aussi dans la faune sauvage (sangliers et ragondins). Le taux d'infection est de 92 % chez les taureaux (140), 31 % chez les ragondins (53) et de 3 % chez les sangliers (110). Le taux d'infection très élevé chez les taureaux par rapport à d'autres troupeaux pourrait s'expliquer par le fait qu'ils ne sont pas traités aux anti-helminthiques (médicaments antiparasitaires permettant d'éradiquer les vers parasites) et que l'élevage est mené de façon extensive. Les bovins sont donc exposés au risque d'infection toute l'année. Cependant, aucun impact sur la santé du troupeau n'est observé. La race Camargue, ayant « évolué » avec le parasite, y serait tolérante, contrairement à d'autres races qui semblent beaucoup plus touchées (avec par exemple des baisses de production et une mortalité chez les veaux pour certaines vaches laitières).

D'après les analyses génétiques des douves de bovins, la diversité des parasites est très grande ce qui indiquerait l'existence d'un foyer global ; c'est-à-dire que les taureaux s'infecteraient plusieurs fois au cours de leur vie dans plusieurs endroits créant un échange de parasites entre ces zones. Chez les douves de ragondins, les parasites ont une diversité plus faible. Dans un individu et entre individus il est possible de retrouver des parasites identiques. Ceci peut s'expliquer par le fait que les ragondins vont rarement à plus de 100 m de leur terrier. Les individus d'un même terrier se contamineraient au même endroit contrairement aux bovins.



Emeline Sabourin réalise une série de prélèvements sur le domaine de la Tour du Valat.
© Jean E. Roché

Le rôle de l'escargot d'eau douce dans le cycle du parasite

Des collectes régulières de *Galba truncatula*, appelée aussi communément la limnée tronquée, escargot d'eau douce dont on sait qu'il transmet le parasite ailleurs en France, ont été réalisées sur le domaine de la Tour du Valat (cf.figure 2) au printemps et à l'automne de 2015 à 2017. Sur plus de 1500 limnées disséquées en deux ans, seulement sept limnées parasitées ont été trouvées. Ce faible nombre confirme les résultats d'autres études suggérant que les taux d'infection dans les populations naturelles sont généralement très faibles (de 2 à 7 %). En effet, une seule limnée infestée peut permettre la libération d'une centaine de larves matures (cercaires). Cependant, il est aussi possible qu'une autre espèce de mollusque transmette localement le parasite.

Nous avons aussi étudié la génétique des limnées échantillonnées. Nos résultats montrent que leur mode de reproduction préférentiel est l'autofécondation, un seul individu pouvant être à l'origine de l'installation ou la réinstallation d'une population dans un nouvel habitat. Néanmoins, nous avons observé que ce mode



© Jean E. Roché

de reproduction restait moins utilisé que dans d'autres études, laissant une part importante à la reproduction sexuée. Si l'autofécondation peut être vue comme avantageuse dans les milieux instables et imprévisibles, il est possible que la reproduction sexuée soit au contraire favorisée ici du fait de la stabilité hydrologique permise par la présence de nombreux canaux.

Au terme de cette thèse, nos résultats permettront de mieux connaître l'épidémiologie de la grande douve du foie et de suggérer des préconisations pratiques pour diminuer le taux d'infection dans les élevages (zones à risque où les troupeaux ne devraient pas aller, gestion des niveaux d'eau ou des traitements etc.).

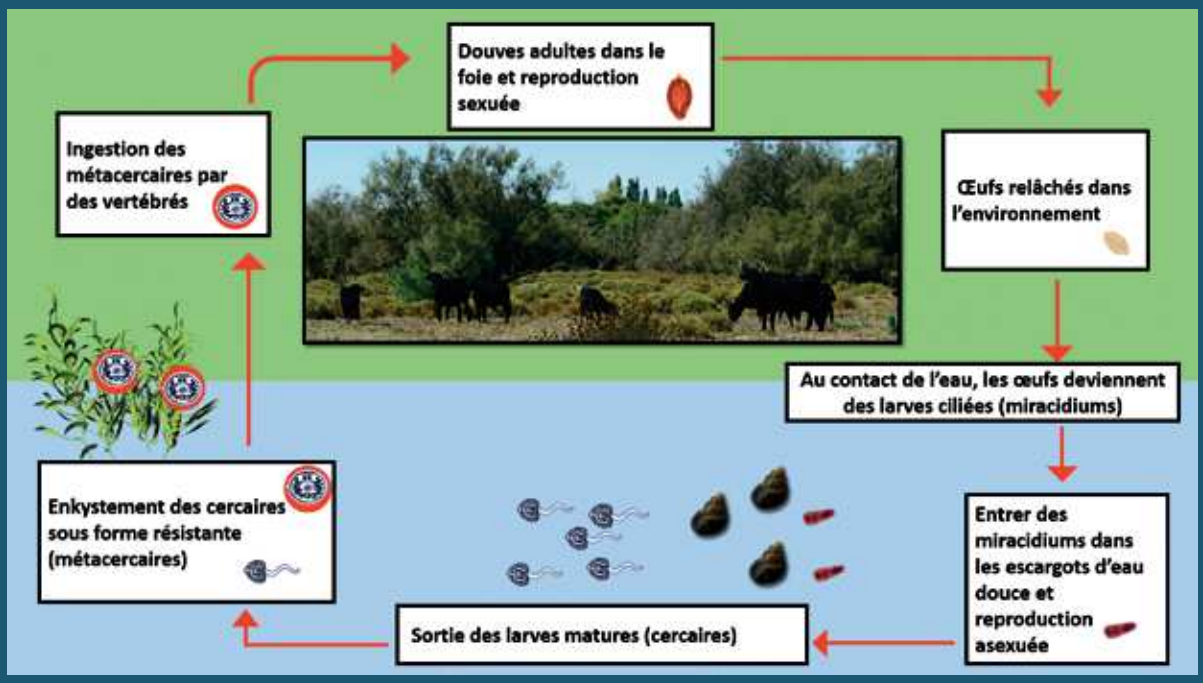


Fig 1 : Cycle de la grande douve du foie

RESPONSABLES : Marion Vittecoq et Sylvie Hurtrez-Boussès,

EQUIPES : Emeline Sabourin, Conservation des espèces-Tour du Valat / IRD-MIVEGEC équipe Santé écologie évolution

PARTENAIRES FINANCIERS : Labex CEMEB

RESSOURCE : Film d'animation présentant le cycle du parasite crée par Emeline Sabourin et Miguel Navascués (visible sur Youtube).

Annexe 4 : Liste des communications

- **Sabourin, E**. Dynamics of the liver fluke in the Camargue and prevalence among bulls, E.Sabourin. Conférence jeunes chercheurs de la Tour du Valat 22 au 24 mars 2016, Arles, France : Présentation orale en anglais
- **Sabourin, E** Dynamique de population de *Galba truncatula* en Camargue. Petit Pois Déridé du 27-30 aout 2016, Amiens, France (Présentation orale en Français).
- **Sabourin, E** Dynamics of the liver fluke in the Camargue and prevalence among bulls. SFE Marseille du 24-28 octobre 2016, Marseille, France (Présentation orale en Anglais).
- **Sabourin, E**, Lounnas, M., Alda, P., Vázquez, A.,Mulero,S ., Carron, E ., Vittecoq,M. Hurtrez-Boussès, S. Dynamique et circulation de *F.hepatica* en Camargue. Petit Pois Déridé en juin 2017. ,Paris, France (Présentation orale en Français).

Glossaire :

Agents pathogènes : Un agent pathogène est un parasite capable d'engendrer une lésion ou de causer une maladie chez les animaux ou chez les plantes.

Allèle : Version d'un gène. Chez un individu diploïde, chaque gène est représenté par deux allèles, situés au même locus sur une paire de chromosomes. Si une mutation survient dans un gène, il peut y avoir apparition d'un nouvel allèle.

Autofécondation : Système de reproduction dans lequel les gamètes mâle et femelle sont issus d'une seule entité génétique (individu ou colonie). L'autofécondation est une forme de reproduction sexuée.

Allofécondation : Organisme pratiquant l'allofécondation, c'est à dire un système de reproduction dans lequel des gamètes mâle et femelle proviennent de deux entités génétiques différentes (individus ou colonies).

Bioaccumulation : La bioaccumulation est l'absorption de substances chimiques, présentes dans l'environnement, et leur concentration dans certains tissus par les organismes.

Chiomiotactisme : Phénomène par lequel des cellules ou des organismes uni-, ou pluricellulaires, se dirigent ou dirigent leurs mouvements en fonction de certaines molécules chimiques présentes dans l'environnement.

Trématode Digène : Clade de Plathelminthes Néodermates, parasites à cycle complexe comprenant au moins deux hôtes, dont le premier hôte intermédiaire est un mollusque gastéropode et l'hôte définitif un Vertébré. Chez ce dernier, le parasite peut infecter le système circulatoire ou les organes viscéraux. Les Digènes rassemblent environ 18 000 espèces. Aux côtés des digènes, les Trématodes comprennent aussi les Aspidogastres, parasites monogènes (un seul hôte) de poissons et tortues.

Co-évolution / Co-adaptation : Processus d'adaptation réciproque qui se produisent au cours de l'évolution entre deux espèces (coévolution par paire) ou plus de deux espèces (coévolution diffuse) à la suite de leurs influences réciproques.

Course aux armements : Situation de coévolution adaptative entre deux espèces dans laquelle les stratégies évolutives de l'une répondent aux stratégies de l'autre, et réciproquement.

DALY : Une DALY peut être considérée comme une année perdue de vie "saine. C'est la mesure de l'écart entre l'état de santé actuel de l'ensemble d'une population en prenant en compte les maladies et une situation sanitaire idéale, dans laquelle la population entière vit jusqu'à un âge avancé, sans maladie ni handicap.

Dérive génétique : Changement de fréquence des allèles dans une population de taille finie dû à l'échantillonnage aléatoire des gamètes

Diversité génétique : Variété des gènes au sein d'une même espèce.

Ecosystème : un écosystème est un ensemble formé par une communauté d'êtres vivants dans son environnement. Les composants de l'écosystème développent un dense réseau de dépendances, d'échanges d'énergie, d'information et de matière permettant le maintien et le développement de la vie.

Effet fondateur : Résultat de la fondation d'une nouvelle population par des individus porteur d'une partie seulement de la variation génétique totale de la population source.

Emergence : Apparition d'une maladie alors inconnue dans la région étudiée.

Epidémie : voir **Epizootie**

Epizootie : Maladie touchant une espèce d'animal ou un groupe d'espèces d'animales dans une région donnée. Une épizootie peut devenir une **épidémie** si le parasite est transmis à l'espèce humaine.

Force évolutive : Phénomènes influençant le destin d'un allèle ou du polymorphisme dans une population. On distingue plusieurs forces évolutives : La **sélection**, la **migration**, les **mutations** et la **dérive génétique**.

Flux génétique : Dispersion de gènes dans et entre les populations. Le flux de gènes peut modifier les fréquences alléliques et est donc un facteur d'évolution

Génotype : Ensemble de tous les gènes d'un individu, c'est-à-dire l'ensemble des **allèles** qu'il porte, qu'ils s'expriment ou non. Un génotype multi locus est donc l'ensemble des allèles retrouvés aux locus étudiés. On parle aussi d'haplotype quand il s'agit de données de séquences.

Goulots d'étranglements : Processus démographique où une population connaît une diminution drastique de son nombre d'individus.

Hôte intermédiaire : Hôte nécessaire à l'accomplissement du cycle parasitaire, où le parasite peut effectuer un développement mais pas sa reproduction sexuée qui se fait exclusivement dans l'**hôte définitif**.

Hôte définitif : Hôte nécessaire à l'accomplissement du cycle parasitaire, où le parasite effectue sa reproduction sexuée.

Hôte compétent : Probabilité d'un hôte non immunisé de devenir infectieux après s'être infecté. Ceci traduit l'aptitude d'un hôte à s'infecter puis à transmettre le parasite à un autre hôte.

Infestation = Infection : Une infection ou une infestation désigne l'envahissement d'un hôte par un parasite puis sa multiplication.

Métapopulation : Groupe de sous-populations partiellement isolées et connectées entre elles par dispersion. Les dynamiques d'extinction-recolonisation sont facilitées par l'échange d'individus ou de propagules entre les sites.

Migration : Echange d'individus, et donc de gènes, entre populations. Ces échanges sont aussi appelés **flux génique**. Elles peuvent aussi y introduire de nouveaux mutants.

Mutation : Modification du génome.

Panmixie : Type de reproduction où les zygotes sont le produit d'associations aléatoires entre les gamètes d'une même population.

Pathogénécité : Pouvoir pathogène, capacité (d'un agent pathogène) de causer une maladie

Pandémie : C'est une **épidémie** présente sur une large zone géographique

Plathelminthes : (« vers plats ») Groupe de métazoaires lophotrochozoaires, caractérisés notamment par un tube digestif à une seule ouverture. Les Plathelminthes comprennent deux clades : les Turbellariés (ensemble paraphyléptique d'au moins sept groupes) et les Néodermates, tous parasites, caractérisés par un tégument syncitial, incluant les Monogènes, les Trématodes et les Cestodes.

Phylogéographie : Discipline intégrant la phylogénétique et la génétique des populations pour l'étude des interactions entre des phénomènes micro et macro évolutifs.

Prévalence : Contrainte environnementale qui affecte les valeurs sélectives des individus et induit des variations de la composition d'une population d'une génération à l'autre.

Pression de sélection : Contrainte environnementale qui affecte les valeurs sélectives des individus et induit des variations de la composition d'une population d'une génération à l'autre.

Réermergence : C'est la réapparition d'une maladie déjà connue mais que l'on pensait limitée.

Réseaux trophiques : Un réseau trophique est un ensemble de chaînes alimentaires reliées entre elles au sein d'un écosystème et par lesquelles l'énergie et la biomasse circulent (échanges d'éléments tels que le flux de carbone et d'azote entre les différents niveaux de la chaîne alimentaire, échange de carbone entre les végétaux).

Résistance : la capacité d'un parasite à résister aux effets d'un médicament qui agit contre lui

Richesse allélique : La richesse allélique d'une population, définie comme le nombre d'allèles présents à un locus donné, est connue pour dépendre de la taille de l'échantillon, puisque les chances de découvrir un nouvel allèle augmentent chaque fois qu'un nouvel individu est observé (Foulley et Ollivier, 2006).

Sélection naturelle : Mécanisme de l'évolution du aux différences de valeur sélective entre les individus d'une population, dans un environnement donné.

Traits d'histoire de vie : Caractères qui influent sur la valeur sélective d'un individu. Des exemples de tels traits sont le développement, la survie juvénile, la croissance, l'âge à maturité, l'âge à la première reproduction, la fécondité, la dispersion, la sénescence, l'âge de mort etc.

Résumé : L'émergence et la ré-émergence de maladies que nous connaissons depuis ces cents dernières années représentent une véritable crise sanitaire en grande partie due aux perturbations anthropiques qui modifient les écosystèmes et les interactions entre les parasites et leurs hôtes. La prévention et le contrôle des maladies infectieuses nécessitent la compréhension de leur dynamique dans l'ensemble des compartiments dans lesquels elles circulent. Parmi ces maladies, la fasciolose est une maladie particulièrement sensible aux changements liés à l'Homme. Cette zoonose causée par le parasite *Fasciola hepatica*, est communément reconnue comme un problème vétérinaire, mais aussi de santé publique, dans certaines régions du monde. Notre étude vise à comprendre la dynamique de circulation et les risques d'émergence de la fasciolose dans un contexte de forte anthropisation. Il s'agit (1) d'étudier la dynamique de l'hôte intermédiaire, un mollusque de la famille des lymnaieidae. (2) de comprendre la dynamique et la diversité du parasite entre et au sein de ses différents compartiments hôtes définitifs. Ces travaux ont été menés sur le territoire camarguais sur le domaine de la Tour du Valat, nous permettant d'avoir accès aux hôtes définitifs, sauvages (ragondins et sangliers), domestiques (taureaux traités et non traités) et à l'hôte intermédiaire, *Galba truncatula* appelé communément limnée tronquée. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la végétation des habitats favorables à la présence du mollusque et nous avons trouvé que les mares semblaient être des zones présentant un risque plus important que les canaux d'irrigation pour la transmission de la fasciolose. Puis, nous nous sommes intéressées à l'influence des habitats sur la dynamique de *G. truncatula* par des approches de génétique des populations. Nos résultats ont permis de montrer que la permanence des habitats et la connectivité influencent le mode de reproduction, la structuration des populations et la dispersion des limnées en Camargue. Dans un second temps, nous avons étudié la dynamique et la circulation du parasite au sein du compartiment hôte définitif. Nos résultats de la génétique des populations du parasite chez les hôtes définitifs, nous ont indiqué qu'il existait sur notre site d'étude plusieurs sites de transmission constituant un seul grand foyer global. Par ailleurs, l'étude de la circulation du parasite entre les hôtes définitifs suggère le rôle des sangliers dans la dispersion de la maladie et le rôle des ragondins dans le maintien du cycle de la fasciolose. Cette étude met en évidence l'intérêt de mener des études à long terme et l'importance de prendre en compte tous les compartiments impliqués pour comprendre l'épidémiologie d'une maladie. Elle souligne également le rôle des activités humaines et de l'écosystème dans la dynamique de la fasciolose. Le but final de cette étude est de proposer une gestion intégrée adaptée au contexte camarguais afin de limiter l'impact sanitaire de la fasciolose mais aussi des autres maladies liées à l'élevage dans cette région.

Mots clés : *Fasciola hepatica, Galba truncatula*, structure génétique, gestion intégrée, gestion de l'eau

Abstract: The emergence and re-emergence of diseases encountered over the last hundred years represent a real health crisis largely due to anthropic disturbances that affect the ecosystems as well as the interactions between parasites and hosts. The prevention and control of emerging infectious diseases require an in-depth understanding of their dynamics in all the compartments in which they occur. Among these diseases, Fasciolosis is particularly sensitive to human related changes. This zoonosis caused by the parasite *Fasciola hepatica*, is commonly recognized as a veterinary problem and major public health issue in certain countries. Our study aims to understand the circulation dynamics and risks of fasciolosis emergence in a context of high anthropization. Our objective is (1) to study the dynamics of the intermediate host, a mollusc of the lymnaieidae family. (2) to understand the dynamics and diversity of the parasite between and within its different definitive host compartments. This work was carried out in the Camargue in the Tour du Valat estate, allowing us to have access to the definitive hosts, wild (nutria and wild boars), domestic (treated and untreated bulls) and the intermediate host, *Galba truncatula*. First, we characterized the habitats that are favorable to the intermediate host *G. truncatula*, presence in Camargue and we found that ponds appear to be areas of higher risk than irrigation channels for fasciolosis transmission. Then, we became interested in the influence of habitats on the dynamics of *G. truncatula* through population genetics approaches, our results showed that habitat permanence and connectivity influence the reproduction mode, population structure and dispersal of *G. truncatula* in the Camargue. In a second step, we studied the dynamics and circulation of the parasite within the definitive host compartment. Our results of the population genetic analyses of definitive hosts indicated that there were several transmission sites on our study area that constituted a single large global outbreak. In addition, the study of the circulation of the parasite between wildlife and domestic animals suggests the role of wild boars in the spread of the disease and the role of nutrias in maintaining the fasciolosis cycle. Our work highlights the value of long term studies and the importance of taking into account all the compartments involved to understand the epidemiology of a disease. They also emphasize the role of human activities and ecosystem in the dynamics of fasciolosis. The ultimate goal of this study is to propose integrated management measures adapted to the Camargue context in order to limit the health impact of fasciolosis and other livestock diseases in the region.

Key words: *Fasciola hepatica, Galba truncatula*, population genetics, anthropic disturbance, water management