

L'importance de combiner les approches morphologiques et moléculaires pour l'identification taxonomique des mollusques : le cas des hôtes intermédiaires des parasites responsables de la protostrongylose du lièvre

Cécile Patrelle, NaturAgora Développement, 1 rue du pont de la planche, 02000 Barenton-Bugny, France / EA 4688 VECPAR, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France. cecile.patrelle@gmail.com
Célia Lesage, NaturAgora Développement, 1 rue du pont de la planche, 02000 Barenton-Bugny, France / EA 4688 VECPAR, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France.
Sylvain Vrignaud, USR 3278 CNRS-EPHE-Université Perpignan, Perpignan, France.
Anouk Decors, Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Direction des études et de la recherche, 5 rue de Saint Thibaud, 78610 Auffargis, France.
Hubert Ferté, EA 4688 VECPAR, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France.
Damien Jouet, EA 4688 VECPAR, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France.
Reçu le 06 juillet 2016, accepté le 25 novembre 2016

Introduction

Depuis 2006, est observée une recrudescence de cas de protostrongylose chez les Lièvres européens *Lepus europaeus* Pallas, 1778 dans le Sud-Est de la France (réseau SAGIR). Cette parasitose est due à des nématodes parasites de la famille des *Protostrongylidae* Leiper, 1926, et de la superfamille des *Metastrongyloidea* (Boev, 1975), et touche les ruminants domestiques et sauvages tels les bovidés (ovins et caprins), les cervidés, et les lagomorphes (Anderson 2000, Boev 1975, Carreno & Hoberg 1999). Les nématodes parasites se localisent dans les branchioles et les alvéoles pulmonaires, induisant une détérioration des fonctions respiratoires ayant pour conséquence une réduction de la productivité, allant parfois jusqu'à la mort de l'animal parasité (Chroust *et al.* 2012, Kralka 1983, Panayotova-Pencheva 2005, Pelletier 2005). La protostrongylose a d'ailleurs été impliquée dans plusieurs épidémies responsables d'importantes mortalités (Stelfox 1971).

En France, une étude récente menée par notre équipe a permis d'identifier deux espèces responsables de cette maladie pulmonaire, très répandue chez les lagomorphes en France: il s'agit de *Protostrongylus (Pulmostrongylus) pulmonalis* (Frölich, 1802) et *P. oryctolagi* Baboš, 1955 (Lesage *et al.* 2014). Ces agents pathogènes ont un cycle de vie complexe et passent par un hôte intermédiaire, un mollusque terrestre (escargot ou limace), avant de parasiter leur hôte définitif : le lièvre (Figure 1).

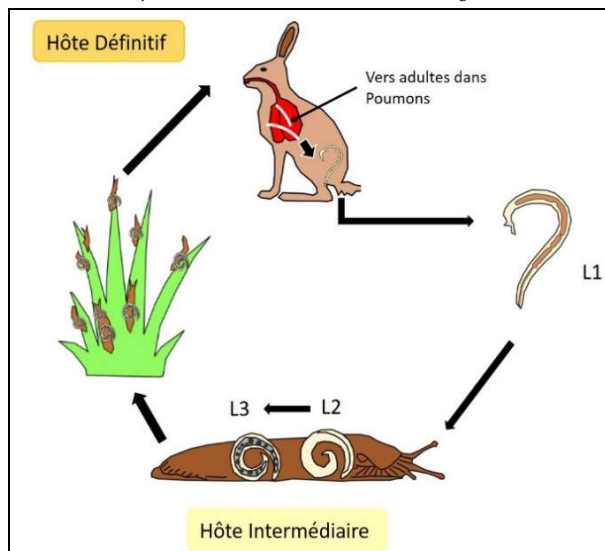


Figure 1: Cycle parasitaire des nématodes du genre *Protostrongylus* responsables de la protostrongylose du lièvre d'Europe (Boch 1988).

Les vers adultes localisés dans les poumons de leur hôte (le lièvre) vont se reproduire et donner naissance à des larves de stade L1, qui sont éliminées dans l'environnement dans les fèces. Les larves pénètrent ensuite dans un mollusque, de façon active par la sole pédieuse, ou passive par ingestion. Elles rejoignent ensuite les muscles du pied de cet hôte intermédiaire et subissent deux mues successives pour passer aux stades L2 puis L3 (Cabaret 1981, 1982). C'est en consommant un mollusque parasité

que le lièvre va alors se contaminer (Boch 1988, Gibson *et al.* 2002, Hibler *et al.* 1972, Platt *et al.* 1984, Rezac *et al.* 1994, Samson *et al.* 1984, 1985).

Si plusieurs espèces de mollusques ont été identifiées comme étant des hôtes intermédiaires de *P. pulmonalis* par de précédentes études, telles *Oxyloma elegans* (Risso, 1826) (Grewal *et al.* 2003), aucune étude n'a été menée concernant la seconde espèce *P. oryctolagi*. Or, dans un contexte d'épidémiologie, il est important d'identifier les agents pathogènes, mais aussi tous les acteurs du cycle parasitaire en conditions naturelles. En effet, évaluer l'importance de la maladie pour l'espèce concernée, comprendre les mécanismes d'apparition, d'entretien et de persistance de la maladie, en lien étroit avec les connaissances relatives aux espèces, permettent de déterminer les mesures de gestion des risques sanitaires les plus adaptées.

Ainsi, une étude a été menée afin d'identifier des différents agents impliqués dans le cycle parasitaire de ces nématodes, en combinant les approches morphologiques et moléculaires sur les parasites et les mollusques.

Matériels et méthodes

Collectes

L'étude a été réalisée dans quatre départements dans le Sud-Est de la France où de nombreux lièvres européens ont trouvé la mort suite à des protostrongyloses sévères : l'Ardèche, l'Hérault, le Tarn et le Vaucluse. Au sein de ses quatre départements, deux sites ont été prospectés représentant une centaine d'hectares, l'un en prairie ouverte et le second dans un vignoble. Chacun des huit sites a alors fait l'objet de collectes de gastéropodes terrestres le long de trois transects de 1 km à raison de cinq points de collecte d'1m². Sur chaque point était disposée une planche en bois surélevée sous lesquelles les mollusques trouvent refuge (Cucherat & Demuyneck 2008). Les collectes ont été réalisées tous les mois, de septembre 2012 à novembre 2013 (sauf l'été de juin à août), de préférence entre 6h et 9h du matin.

Examen parasitaire

Chaque mollusque a été disséqué sous loupe binoculaire afin d'isoler la sole pédieuse. Cette dernière a été écrasée entre une lame et une lamelle pour la recherche de larves de parasites (Figure 2). Lorsque des larves ont été observées, elles ont été isolées et leurs extrémités ont été observées au microscope. Toutes celles ayant une bifurcation à l'extrémité antérieure appartiennent à la famille des *Protostrongylidae* (Boev, 1975) (Figure 3), et ont alors été conservées dans de l'éthanol à 90° pour analyses moléculaires. De plus, pour chaque mollusque parasité par des larves de cette famille, un morceau de muscle a lui aussi été stocké dans de l'éthanol à 90°.

Identification taxonomique

Les échantillons (larves et mollusques) ont fait l'objet d'identification basée sur des critères morphologiques (spicules, gubernaculum ou bien critères de la coquille), puis moléculaires (séquençage des domaines ITS2 et 28S de l'ADN nucléaire chez les larves, et ITS1, 18S de l'ADN nucléaire et 16S et COI de l'ADN mitochondrial pour les gastéropodes), en comparant nos séquences à celles de référence déposées dans la base de données internationale GenBank. La confrontation des deux approches nous permet alors de déterminer avec robustesse les espèces auxquelles appartient chaque échantillon.

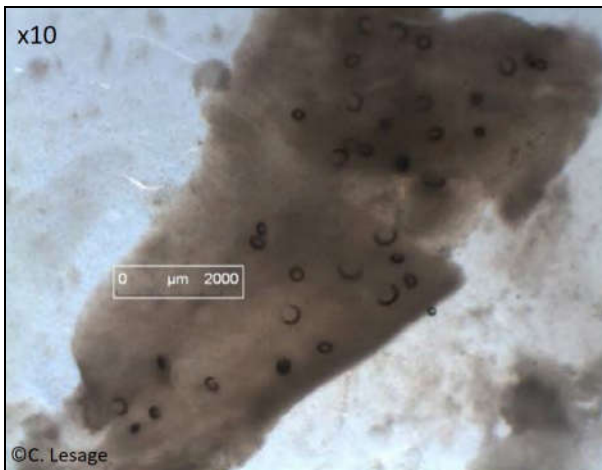


Figure 2 : Photo d'une sole pédieuse de mollusque écrasée entre lame et lamelle observée à la loupe binoculaire et infestée par de nombreuses larves de parasites.

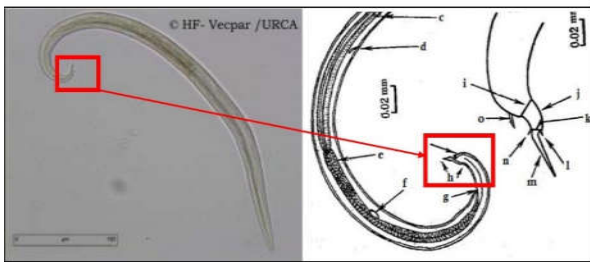


Figure 3 : Photo d'une larve de protostrongle observée au microscope à gauche, et dessin représentant l'extrémité céphalique caractéristique des larves de cette famille à droite (d'après Boev 1975).

Résultats et discussions

Au total, 3 622 mollusques ont été collectés, parmi lesquels 3 315 escargots et 307 limaces. Parmi ces mollusques, 18 escargots étaient infestés de larves de Protostrongles, représentant une prévalence parasitaire de 0.54%, tandis qu'aucune limace n'était parasitée. Un total de 123 larves de stade L3 a été observé, avec une moyenne de 7 larves par escargot (de 1 à 52 larves/escargot). Les 18 escargots parasités venaient tous des vignes situées dans les quatre départements.

À l'issue des identifications morphologiques, les 18 escargots parasités appartiennent tous à deux familles : les Helicidae ou les Hygromidae. Selon les critères des coquilles, cinq espèces ont été identifiées : *Xeropicta derbentina* (Krynicky, 1836) (n=8), *Ceruellia virgata* (Da Costa, 1778) (n=5), *Ceruellia neglecta* (Draparnaud, 1805) (n=2), *Candidula gigaxii* (L. Pfeffer, 1847) (n=2) et *Helicella itala itala* (Linnaeus, 1758) (n=1).

Suite aux analyses moléculaires, un arbre phylogénétique basé sur les quatre domaines séquencés a été construit (méthode ML) avec des échantillons d'escargot identifiés morphologiquement, et la confrontation des deux approches s'est avérée non concluante (Figure 4). Ce résultat peut avoir deux explications : 1) les identifications morphologiques de nos escargots parasités n'étant basée que sur la coquille, les déterminations spécifiques sont peut-être fausses ; 2) les séquences déposées dans GenBank nous servant de références ont peut-être été mal identifiées. Grâce à une analyse fine des différentes études ayant publiées les séquences, la seconde hypothèse semble être la plus plausible. En effet, certains mollusques dont la séquence a été déposée n'ont été identifiés qu'à partir de photos de la coquille. Dans d'autres cas, l'identification morphologique a été réalisée sur un individu qui n'a pas servi à l'analyse génétique et c'est un autre qui a été séquencé.

Parmi les quatre espèces d'escargots infestés par les agents pathogènes de la protostrongylose, seul un *Xeropicta derbentina* était porteur de *P. pulmonalis*, tandis que les 17 autres escargots appartenant aux quatre espèces étaient infestés par *P. oryctolagi*. C'est la première fois que ces quatre espèces d'escargot sont observées parasités par ces nématodes en conditions naturelles et sont donc identifiés comme hôtes intermédiaires de la protostrongylose. On notera que *X. derbentina* ayant été infesté expérimentalement par *Protostrongylus tauricus* (Boev 1975).

Ainsi, les séquences ITS1 et 18S semblant incertaines, seuls les résultats des domaines 16S et le COI ont été confrontés aux identifications

morphologiques, donnant des résultats convergents (Figure 5). Seuls les deux espèces de *Ceruellia* n'ont pas pu être différenciées génétiquement et sont alors notées *Ceruellia* sp. En effet, seuls les organes génitaux permettent de différencier *Ceruellia virgata* de *C. neglecta*, organes indisponibles lors de notre étude ainsi que lors des études précédentes pour lesquelles les séquences de références ont été déposées dans GenBank.

Conclusion

En combinant les approches morphologiques et moléculaires, les hôtes intermédiaires du cycle parasites de *P. pulmonalis* et *P. oryctolagi*, nématodes parasites responsables de la protostrongylose du lièvre, ont pu être identifiés avec robustesse pour la première fois et en conditions naturelles. Cette étude a montré combien il est important de combiner plusieurs approches afin d'arriver à des identifications taxonomiques fiables et robustes, ce qui n'est possible que grâce au séquençage d'échantillons de références au préalable correctement identifiés morphologiquement. Il s'agit donc ici d'un véritable travail d'équipe associant les spécialistes des différentes approches, combinant leurs compétences respectives afin d'atteindre cet objectif d'identification taxonomique juste.

Comprendre le cycle de vie de ce genre de parasite est essentiel pour identifier les facteurs de risques et gérer, voire maîtriser, les risques de propagation de la maladie. Parmi les deux types d'habitats étudiés, seuls les vignes semblent favorables à ces deux espèces de nématodes parasites. Il serait intéressant par la suite de poursuivre les investigations au sein d'environnements variés afin d'identifier les habitats représentant un risque potentiel pour les populations de lièvres.

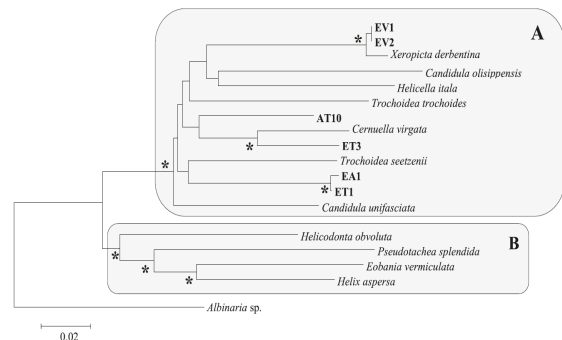


Figure 4 : Arbre phylogénétique basé sur les domaines ITS2, 16S, 18S et COI avec un total de 1677 nucléotides, construit grâce à la méthode de Maximum de parcimonie (ML, GTR + I + Γ). Les astérisques indiquent des valeurs de Bootstraps supérieures à 95 pour les méthodes NJ, ML et ME. A= Hygromiidae, B = Helicidae.

Remerciements - Cette étude a été réalisée grâce aux financements de l'ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage). Les auteurs souhaitent remercier les membres du réseau SAGIR : les chasseurs, les Fédérations Départementales de chasseurs, les agents de l'ONCFS, les Laboratoires Vétérinaires Départementaux d'Ardèche, de l'Hérault, du Tarn et du Vaucluse, ainsi que Fabrice Etienne, Cédric Arnal, Pascal Arnaud, Lise Guennegan, Guillaume Robert, Philippe Aubry, Clément Calenge et Philippe Geniez.

Cet article est une réflexion suite à l'étude « Intermediate hosts of *Protostrongylus pulmonalis* (Frölich, 1802) and *P. oryctolagi* Baboş, 1955 under natural conditions in France » publiée par Célia Lesage, Cécile Patrelle, Sylvain Vrignaud, Anouk Decors, Hubert Ferté et Damien Jouet en 2015 dans la revue Parasites & Vectors (8 :104).

Bibliographie

- Anderson, R., C., 2000. Nematodes parasites of vertebrates : their development and transmission. *CAB International Publishing, Wallingford*. 650pp.
- Boch, H., & Schneidawind, H. 1988. Krankheiten des jagdbaren wildes. *Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin*.
- Boev, S.N. 1975. Protostrongylids, *Fundamentals of Nematology*. Helminthological Laboratory, *Academy of Sciences of the USSR, Moscow*. [English translation by the U.S Department of Agriculture, Washington, D.C., and Amerind Publishing Co., New Dehli, 1984, 338p.].
- Cabaret, J. 1981. Réceptivité des mollusques terrestres de la région de Rabat à l'infestation par les protostrongles dans les conditions expérimentales et naturelles. *Thèse de doctorat, Muséum D'histoire Naturelle de Paris*. Cabaret, J. 1982. Estimation of the infestation of mollusks by protostrongylids: parameters used and their interrelation. *Annual Parasitology Human Company*, 57 : 367–374.

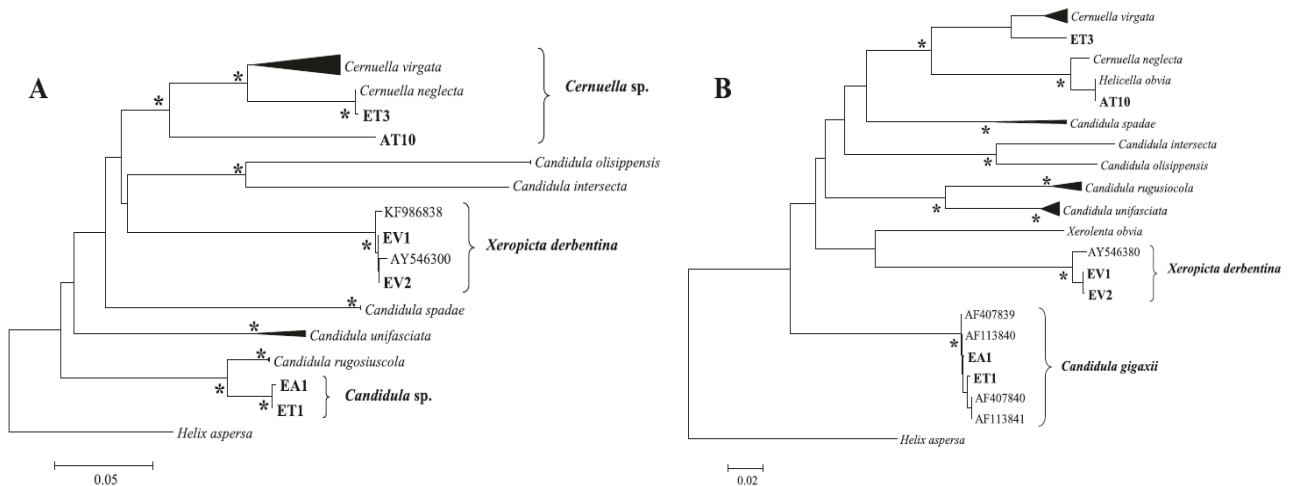


Figure 5 : Arbres phylogénétiques basés sur le domaine 16S (A) ou COI (B) construit grâce à la méthode de Maximum de parcimonie (ML, T92 + Γ). Les astérisques indiquent des valeurs de Bootstraps supérieures à 95 pour les méthodes NJ, ML et ME.

Carreno, R., A., & Hoberg, E., P. 1999. Evolutionary relationships among the protostrongyloidea (Nematoda : Metastrongyloidea) as inferred from morphological characters, with consideration of parasite-host coevolution. *Journal of Parasitology*, 85 : 638–648.

Chroust, K., Vodnansky, M., & Pikula, J. 2012. Parasite load of european bown hares in Austria and the Czech Republic. *Vet Med*, 10 : 551–558.

Cucherat, X., & Demuyynck, S. 2008. Les plans d'échantillonnage et les techniques de prélèvements des mollusques continentaux. *MalaCo*, 5 : 244–253.

Gibson, D., I., Jones, A., & Bray, R., A. 2002. Keys to Trematoda, Volume 1. Wallingford, UK and the Natural History Museum, London, UK: CAB International.

Grewal, P., Grewal, S., K., Tan, L., & Adams, B. 2003. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. *Journal of Nematology*. 35:146–56.

Kralka, R. 1983. Development and transmission of Protostrongylus boughtoni (Nematoda: Metastrongyloidea), a lungworm of the snowshoe hare (Lepus americanus). PhD thesis. *University Of Alberta*.

Lesage, C., Jouet, D., Patrelle, C., Guitton, J.S., Decors, A., & Ferté, H. 2014. Protostrongylus pulmonalis (Frölich, 1802) and P. oryctolagi Baboš, 1955 (Nematoda: Protostrongylidae), parasites of the lungs of European hare (Lepus europaeus L.) in France: morphological and molecular approaches. *Parasitology Research*. 113:2103–11.

Panayotova-Pencheva, M., S. 2005. Epidemiological studies on helminthoses in goats and sheep caused by Protostrongylidae leiper, 1926. *Veterinarski Glasnik*, 59 : 619– 633.

Pelletier, F. 2005. Stratégies de reproduction des males du mouflon d'Amerique (Ovis canadensis). *Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke*.

Platt, T., R., Samuel, W.M. 1984. Mode of entry of first-stage larvae of Parelaphostrongylus odocoilei (Nematoda: Metastrongyloidea) into four species of terrestrial gastropods. *Proceedinf of Helminthology Society of Washington*. 51:205–7.

Rezác, P., Palkovic, L., Holasová, E., Busta, J. 1994. Modes of entry of the first-stage larvae of Elaphostrongylus cervi (Nematoda: Protostrongylidae) into pulmonate snails Arianta arbustorum and Helix pomatia. *Folia Parasitology*. 41:209–14.

Samson, J., Holmes, J. 1984. The effect of temperature on rates of development of larval Protostrongylus spp. (Nematoda: Metastrongyloidea) from bighorn sheep, Ovis canadensis canadensis, in the snail Vallonia pulchella. *Canadian Journal of Zoology*. 63:1445–8.

Samson, J., Holmes, J., C. 1985. Modes of entry of first-stage larvae of Protostrongylus stilesi and P. rushi (Nematoda: Metastrongyloidea) in the snail intermediate host Vallonia pulchella. *Canadian Journal of Zoology*. 63:2481–2.

Stelfox, J. 1971. Bighorn sheep in the Canadian Rockies. A history 1800-1970. *Canadian field Naturalist*, 85 : 101–122.

Les auteurs :

Cécile Patrelle est Responsable de projets au sein du bureau d'études NaturAgora Développement, anciennement chercheur post-doctorale à l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Célia Lesage est Chargée de missions à l'ONCFS, anciennement Doctorante à l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Sylvain Vrignaud est naturaliste, malacologue indépendant

Anouk Decors est Responsable scientifique du réseau SAGIR à l'ONCFS

Hubert Ferté est Maître de Conférences à l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Damien Jouet est Maître de Conférences à l'Université de Reims Champagne-Ardenne