

République Algérienne Démocratique  
et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et la Recherche Scientifique  
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



## THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences  
En Sciences Vétérinaires

### Thème :

**ETUDE DE LA DISTOMATOSE HEPATIQUE BOVINE A  
PARTIR DES ABATTOIRS DE TROIS WILAYATES  
(TIZI-OUZOU, BOUIRA, BEJAIA)**

Présentée par : Dr. Chougar linda

### Les membres du jury :

Encadreur :	HARHOURA Khaled	Pr.	E.N.S.V-Alger
Co-encadreur :	AISSI Miriem	Pr.	E.N.S.V-Alger
Président :	MILA Amel	Pr.	E.N.S.V-Alger
Examineur :	MOULOUA Abdelkamel	M.C.A.	U.M.M-Tizi-Oouzou.
Examineur :	LAATAMNA Abdelkarim	M.C.A.	U. Ziane ACHOUR, Djelfa
Examineur :	ZAIT Houria	M.C.A.	C.H.U. Mustapha Pacha
Examineur :	BAROUDI Djamel	M.C.A.	E.N.S.V-Alger

Soutenu le : 06/02 / 2020.

## Résumé

### Résumé :

Les distomatoses hépatobiliaires sont des zoonoses dues à des trématodes, vers plats non segmentés possédant deux ventouses. On distingue deux principales espèces affectant les bovins en Algérie à savoir *Fasciola hepatica* qui cause une trématodose sévissant de manière endémique dans notre pays et *Dicrocoelium dendriticum* ou petite douve du foie jamais auparavant signalée dans notre zone d'étude. Toutefois, très peu de travaux ont été menés pour déterminer leur prévalence à l'échelle nationale. Aussi, nous avons réalisé une étude sur ces deux distomatoses au niveau des abattoirs de trois wilayas : Tizi-Ouzou, Bouira et Béjaia. A cet effet, 4700 bovins (1658 à T.O. et 1304 à Bouira, 1738 à Bejaia) ont fait l'objet de notre étude, sur lesquels des prélèvements de sang, de bile, de selles et de parasite ont été effectués ainsi qu'une inspection du foie pour la recherche de lésions de cholangite distomienne. Les prélèvements ont été soumis à des analyses coprologiques, l'analyse de la bile et enfin un total de 675 sérums de bovins abattus (325 infestés, 236 avec lésions hépatiques et 114 avec foies macroscopiquement sains) ont fait l'objet d'une analyse sérologique. L'objectif étant de déterminer la variation de l'infestation à *Fasciola hepatica* et la cinétique des anticorps chez chaque bovin selon la saison le sexe, la race et l'âge de l'animal et sa relation avec le degré d'infestation des foies, par l'utilisation du test Monoscreen ELISA. Une analyse histologique des douves de *D. Dendriticum* a été réalisée, Les spécimens ont été identifiés morphologiquement en fonction de l'orientation des testicules, de la longueur et de la largeur du corps et du niveau de la largeur maximale du corps. De plus, une étude moléculaire des échantillons de douves prélevées a été effectuée ; à cet effet l'espace interne transcrit ribosomal (ITS), la cytochrome c oxydase I (COI), la région mitochondriale couvrant les marqueurs COI-trnT-rrnL et la sous-unité NADH déshydrogénase I (NADI) ont été utilisés pour caractériser les douves de *Fasciola* d'Algérie. L'inspection des 4700 foies de bovins a révélé un total de 325(6.91%) foies présentant une infestation à *Fasciola hepatica* (cholangite distomienne) avec 8.28% à Bouira, 5.9% à Béjaia et 6.87% à Tizi-Ouzou, 236(5.02%) présentaient des lésions hépatiques et des cholangites sans présence du parasite et 4139(88.06%) ont montré un foie macroscopiquement sain. L'analyse coprologique a révélé la présence d'œufs du parasite chez 3.17% avec 3.45% à Bouira, 2.93% à Béjaia et 3.19% à Tizi-Ouzou contre une prévalence totale dans la bile de 7.4% avec 8.2% à Bouira, 5.69% à Béjaia et 6.57% à Tizi-Ouzou. Après lecture des résultats sérologiques, 384 (56.9%) sérums se sont révélés être séropositifs (val>15%), 12(1.8%) seulement se sont révélés douteux (10%<val>15%), et 279 (41.3%) séronégatifs (val<10%). La variation des niveaux d'anticorps au sein des sérums positifs était de 83(21.61%) présentant des infestations faibles avec des valeurs comprises entre 15%<val>45%, 111(28.9%) présentant une infestation moyenne comprise entre 45%<val>75% et 190 (49.47%) des bovins présentaient une forte infestation soit val>75%. L'analyse statistique a révélé l'existence d'une association significative entre la variation des taux d'anticorps et le sexe, l'âge de l'animal et la saison de l'année (p<0.001) avec des taux d'anticorps élevés chez les femelles, les animaux plus âgés et durant les saisons Automne, Printemps. Notre étude nous a permis de révéler que la localité influençait sur les niveaux d'anticorps chez les bovins (p<0.001), la localité de Bouira étant celle qui présente les taux d'anticorps les plus élevés. À l'aide d'analyses morphologiques, un seul morphotype de *Fasciola* a été observé. Le marqueur nucléaire ITS a indiqué que toutes les douves collectées appartiennent à *F. hepatica*. Plusieurs alignements de la base de données ITS ont révélé deux haplotypes, l'un décrit ici pour la première fois. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) des marqueurs mitochondriaux a révélé une faible structure de la population en Algérie. L'analyse de Mismatch distributions, les tests de neutralité et l'analyse de median-joining network étaient tous compatibles avec une expansion récente de la population Algérienne de *F. hepatica*. La prévalence totale de la dicrocélioze obtenue après inspection de 4700 bovins est de 0.45% avec des prévalences de 0.66% à Tizi-Ouzou, 0.54% à Bouira, et 0.17% à Bejaia. 0,45% des foies étaient atteints de cholangite distomienne (21 des 4700 foies examinés avaient un *D. dendriticum* adulte) et 13.25% présentaient quant à eux une cholangite non distomienne. 0,21% des bovins avaient des œufs de *D. dendriticum* dans les selles contre 0,45% dans la bile. L'analyse histologique de la douve a révélé un positionnement antérieur des testicules avec une orientation tandem légèrement oblique, une longueur moyenne de 3,69 mm et une largeur moyenne de 1 mm soit au milieu du corps, soit en position arrière. L'analyse statistique a révélé

l'existence d'une faible association significative entre l'infection aux deux distomatoses et la saison de l'année ( $p < 0,05$ ). Cependant, une forte association significative a été observée entre les deux infections et le sexe et l'âge de l'animal ( $p < 0,001$ ); étant plus fréquente chez les animaux plus âgés et les femelles. Nos résultats montrent une plus grande sensibilité de la sérologie qui nous permet de détecter l'infestation dès les premières semaines poste infestation. La fasciolose apparaît très répandue dans les différentes régions d'Algérie. Il semble que l'absence de stratégie de contrôle associée au climat méditerranéen favorable puisse conduire à une reconstruction et à la dispersion de ses populations. Cette étude fournit des résultats importants concernant la caractérisation génétique et la variabilité de *F. hepatica* en Algérie, ainsi que le rôle important de l'importation de bovins dans la détermination de son mode de dispersion dans le monde. L'étude histologique confirme que les douves collectées sont *D. dendriticum*. Ainsi, notre étude révèle pour la 1<sup>ère</sup> fois en Algérie la présence de *D. dendriticum* dans trois wilayas (Bouira, Tizi-Ouzou et Bejaia). Les résultats indiquent que de nombreuses exploitations d'élevage dans la province du centre-nord de l'Algérie sont infestées par *D. dendriticum*.

**Mot clés :** *F. hepatica*, *D. dendriticum*, Bovins, ELISA, Bile, Foie, Coprologie, Histologie, P.C.R., Abattoirs.

## Summary

Hepatobiliary distomatoses are zoonoses due to trematodes, non segmented flatworms with two suckers there are two main species affecting cattle in Algeria namely *Fasciola hepatica* which is a trematode which is endemic in our country and *Dicrocoelium dendriticum* or a little liver fluke never before reported in our study area. However, very few studies have been conducted to determine their prevalence at the national level. Also, we carried out a study on these two distomatoses at the level of slaughterhouses of three wilayas: Tizi-Ouzou, Bouira and Bejaia. For this purpose, 4700 cattle (1658 to T.Ouzou, 1304 to Bouira and 1738 to Bejaia) were the subject of our study, on which blood, bile, stool and parasite samples were taken as well as liver inspection for the investigation of distomial cholangitis lesions. The specimens were subjected to stool analysis, the analysis of the bile and finally a total of 675 (325 infested, 236 with liver lesions and 114 with macroscopically healthy livers) serums of cattle slaughtered were analyzed; the objective being to determine the variation of *Fasciola hepatica* infestation and antibody kinetics in each cattle by season, sex, race and age of the animal and its relation to the degree of liver infestation, by the use of the Monoscreen ELISA test. A histological analysis of the *D.Dendriticum* parasite was performed. The specimens were identified morphologically according to the orientation of the testes, the length and width of the body and the level of the maximum width of the body. Also a molecular study of the samples of *Fasciola sp* taken was carried out; for this purpose the ribosomal internal transcribed spacer (ITS), cytochrome c oxidase I (COI), the mitochondrial region spanning the COI-trnT-rrnL, and the NADH dehydrogenase subunit I (NADI) markers were used to characterize *Fasciola* flukes from Algeria. Inspection of 4700 livers of cattle revealed a total of 325 (6.91%) livers with infestation with *Fasciola hepatica* (distomial cholangitis) with 8.28% in Bouira, 5.9% in Bejaia and 6.87% in Tizi-Ouzou, 236 (5.02 %) had liver lesions and cholangitis without presence of the parasite and 4139 (88.06%) showed macroscopically healthy liver. the coprological analysis revealed the presence of eggs of the parasite in 3.17% with 3.45% in Bouira, 2.93% in Bejaia and 3.19% in Tizi-Ouzou against a total prevalence in bile of 7.4% with 8.2% in Bouira, 5.69 in Béjaia and 6.57% in Tizi-Ouzou. After reading the serological results 384 (56.9%) sera were found to be seropositive ( $> 15\%$ ) and 12 (1.8%) only were doubtful results ( $10\% < \text{val} < 15\%$ ), and 279 (41.3%) seronegative or ( $\text{val} < 10\%$ ), the variation in antibody levels in the positive sera was 83 (21.61%) with low infestations with values between ( $15\% < \text{val} < 45\%$ ), 111 (28.9%) ) with a mean infestation of between ( $45\% < \text{val} < 75\%$ ) and 190 (49.47%) of the cattle had a high infestation ( $\text{val} > 75\%$ ), the statistical analysis revealed the existence of a significant association between variation in antibody levels and sex, age of the animal and season of the year ( $p < 0.001$ ) with high antibody levels in females, older animals, and seasons Autumn, Spring. Our study revealed that

locality influenced antibody levels in cattle ( $p < 0.001$ ), the locality of Bouira being the one with the highest antibody levels. Using morphological and morphometric analysis, one morphotype of *Fasciola* was observed. Nuclear ITS marker indicated that all collected flukes belong to *F. hepatica*. Multiple alignments of ITS dataset revealed two haplotypes, one described here for the first time. Analysis of molecular variance (AMOVA) of mitochondrial markers revealed weak population structure in Algeria. Mismatch distributions, neutrality tests, and median-joining network analysis all were compatible with a recent expansion of Algerian. The total prevalence of dicrocoeliasis obtained of the 4053 cattle inspected is 0.52% with a prevalence of 0.66% in Tizi-Ouzou, 0.54% in Bouira, and 0.27% in Bejaia. About 0.52% of livers had distomial cholangitis (21 of the 4053 livers examined had adult *D. dendriticum* and 15% had non-distomial cholangitis. About 0.25% of cattle had *D. dendriticum* eggs in the stool versus 0.52% of cattle had parasite eggs in the bile. Histological analysis of the fluke revealed an anterior positioning of the testicles with a slightly oblique tandem orientation, an average body length of 3.69 mm and an average body width of 1 mm. The maximum body width level is either in the middle of the fluke body or in the rear position. Statistical analysis revealed a small, significant association between infection with both distomatoses and the season of the year ( $p < 0.05$ ). However, a strong, significant association was observed between the two infections and the sex and age of the animal ( $p < 0.001$ ); being more common in older animals and females. Our results show a greater sensitivity of the serology that allows us to detect infestation from the first weeks post infestation. Fasciolosis appeared common in Algerian cattle, it seems that the absence of control strategy coupled to the favorable Mediterranean climate may lead to a reconstruction and dispersion of its populations. This study provides important results concerning the genetic characterization and variability of *F. hepatica* in Algeria as well as the significant role of cattle importation in shaping its dispersal route worldwide. The histological study confirms that the collected fluke is *D. dendriticum*. Thus, this work reveals for the 1<sup>st</sup> time in Algeria the presence of *D. dendriticum* in three districts (Bouira, Tizi-Ouzou, and Bejaia). The results indicate that many cattle farms in the North Central Province of Algeria are infested with *D. dendriticum*.

**Key words:** *F. hepatica*, *D. dendriticum*, Cattle, ELISA, Bile, Liver, Coprology, Histology, PCR, Slaughthouses.

## خلاصة:

التهاب الكبد الصفراوي هي أمراض حيوانية المصدر بسبب التريماطودا ، والديدان المسطحة غير المقسمة مع مصاصين ، وهناك نوعان رئيسيان يؤثران على الماشية في الجزائر وهما *Fasciola hepatica* الذي هو trematode الذي يتوطن في بلدنا و *Dicrocoelium dendriticum* أو حظ صغير في الكبد لم يبلغ عنه من قبل في منطقة دراستنا. ومع ذلك ، فقد أجريت دراسات قليلة جدا لتحديد مدى انتشارها على المستوى الوطني. كذلك ، قمنا بإجراء دراسة على هذين التريماطودا على مستوى المسالخ في ثلاث ولايات: تيزي وزو ، البويرة وبجاية. لهذا الغرض ، كانت 4700 ماشية (1658 إلى TO و 1304 إلى البويرة ، إلى 1738 بجاية) موضوع دراستنا ، والتي أخذت عينات من الدم والصفراء والبراز والطفيلي وكذلك فحص الكبد للتحقيق في آفات التهاب . تعرضت العينات لتحليل البراز ، وتحليل الصفراء وأخيرا مجموع 675 (325 المصابة ، و 236 مع آفات الكبد و 114 مع كبد صحي بالعين) تم تحليل مصل ذبح الماشية. والهدف من ذلك هو تحديد تباين الإصابة مع *F. hepatica* والأجسام المضادة في كل ماشية حسب الموسم والجنس والعرق وعمر الحيوان وعلاقته بدرجة الإصابة بالكبد. ، عن طريق استخدام اختبار ELISA Monoscreen تم إجراء التحليل النسيجي للطفيليات *D. dendriticum* ، وتم تحديد العينات شكليا حسب اتجاه الخصيتين ، وطول وعرض الجسم ومستوى أقصى عرض للجسم. كما تم إجراء دراسة جزيئية لعينات *Fasciola sp* ، ولهذا الغرض ، فإن the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) ، السيتوكروم سي أوكسيداز الأول (COI) ، ومنطقة الميتوكوندريا التي تغطي علامات COI-trnT-rrnL - تم استخدام NADH dehydrogenase unit I (NADI) لوصف طفيليات *Fasciola* في الجزائر. وكشف فحص 4700 كبدًا من الماشية مجموع 325 كبدًا (6.91%) مصابة بالتهاب *F. hepatica* (التهاب الأفتية الصفراوية مع وجود الطفيليات) مع نسبة 8.28% في البويرة و 5.9% في بجاية و 6.87% في تيزي وزو و 5.02% كان آفات الكبد والتهاب الأفتية الصفراوية دون وجود الطفيليات وأظهرت 4139 (88.06%) كبد صحي. كشف تحليل البراز عن وجود بيض الطفيلي بنسبة 3.17% مع 3.45% في البويرة و 2.93% في بجاية و 3.19% في تيزي وزو ، مقابل انتشار وجود البيض في الصفراء بنسبة 7.4% مع 8.2% في البويرة ، 5.69% في بجاية و 6.57% في تيزي وزو. بعد قراءة النتائج المصلية ، تم العثور على 384 (56.9%) الأمصال إيجابية المصل مع (15% <val> 1.8%) كانت فقط مشكوك فيها (10% <val> 15%) ، و 279 (41.3%) سلبين أو (10% <val> 10%) ، كان التباين في مستويات الأجسام المضادة في الأمصال الإيجابية 83 (21.61%) مع الإصابات المنخفضة مع القيم بين (45% <val> 15%) ، 111 (28.9%) مع وجود معدل إصابة يتراوح بين (75% <val> 45%) و 190 (49.47%) من الماشية كانت مصابة عالية (75% <val> 75%) ، وكشف التحليل الإحصائي وجود علاقة كبيرة بين التباين في مستويات الأجسام المضادة والجنس وعمر الحيوان وموسم السنة ( $p > 0.001$ ) مع مستويات الأجسام المضادة عالية في الإناث ، والحيوانات الأكبر سنا ، والموسم الخريف و الربيع. كشفت دراستنا أن المنطقة أثرت على مستويات الأجسام المضادة في الماشية ( $p > 0.001$ ) ، محلة البويرة هي واحدة من أعلى مستويات الأجسام المضادة. باستخدام التحليلات المورفولوجية ، لم يلاحظ إلا شكل واحد من أشكال *Fasciola*. أشارت علامة ITS النووية إلى أن جميع طفيليات التي تم جمعها تنتمي إلى *F. hepatica*. كشفت العديد من محاذاة قاعدة بيانات ITS عن نوعين من الأنواع ، أحدهما موصوف هنا لأول مرة. كشف تحليل التباين الجزيئي (AMOVA) لعلامات الميتوكوندريا عن وجود بنية سكانية ضعيفة في الجزائر. كان تحليل Mismatch distributions واختبارات الحيادية وتحليل median-joining network جميعها متسقة مع التوسع الأخير لعينات *F. hepatica* الجزائر. يبلغ معدل انتشار الإصابة بمرض *D. dendriticum* الذي تم الحصول عليه بعد فحص 4700 رأس من الماشية 0.45% مع انتشار 0.66% في تيزي وزو ، و 0.54% في البويرة ، و 0.17% في بجاية. ما يقرب من 0.45% من الكبد كان التهاب الأفتية الصفراوية مع وجود الطفيليات (21 من 4700 الكبد فحصت لديهم *D. dendriticum*) و 13.25% ذكرت التهاب الأفتية الصفراوية دون وجود الطفيليات. حوالي 0.21% من الماشية كانت تحتوي على بيض *D. dendriticum* في البراز مقابل 0.45% في الصفراء. وكشف التحليل النسيجي للفوك عن الموقع الأمامي للخصيتين مع اتجاه ترادفي منحرف قليلاً ، يبلغ متوسط طوله 3.69 مم ويبلغ متوسط عرضه 1 مم إما في منتصف الجسم أو في الموقع الخلفي. وكشف التحليل الإحصائي وجود علاقة صغيرة مهمة بين الإصابة بكلا الطفيليات وموسم السنة ( $P < 0.05$ ). ومع ذلك ، لوحظ وجود علاقة قوية ، بين الإصابتين و جنس وعمر الحيوان ( $P < 0.001$ ) ؛ كونها أكثر حضورا في الحيوانات الأكبر سنا والإناث. تظهر نتائجنا حساسية أكبر للأمصال التي تسمح لنا باكتشاف الإصابة من الأسابيع الأولى بعد الإصابة. يبدو أن مرض *F. hepatica* تلقى ترحيباً جيداً في مختلف مناطق الجزائر ، ويبدو أن عدم وجود استراتيجية تحكم مرتبطة بمناخ البحر الأبيض المتوسط الملائم يمكن أن يؤدي إلى إعادة البناء وإلى تشتت سكانها. تقدم هذه الدراسة نتائج مهمة فيما يتعلق بالتوصيف الوراثي والتنوع الوراثي ل *F. hepatica* في الجزائر ، وكذلك الدور الهام لاستيراد الماشية في تحديد نمط تشتت في العالم. تؤكد الدراسة النسيجية أن الطفيليات التي تم جمعها هي *D. dendriticum* . وهكذا ، كشفت دراستنا لأول مرة في الجزائر عن وجود *D. dendriticum* في ثلاث ولايات (البويرة وتيزي وزو وبجاية). تشير النتائج إلى أن العديد من مزارع الماشية في المقاطعة الشمالية الوسطى من الجزائر تنتشر فيها *D. dendriticum*

الكلمات المفتاحية: *F. hepatica* ، *D. dendriticum* ، ELISA ، الصفراء ، الكبد ، علم البراز ، الأنسجة ، PCR ، مجازر

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie mon dieu qui m'a donné la patience et la volonté pour la réalisation de ce travail.

Au Professeur **HARHOURA Khaled** promoteur de cette étude. Je le prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et ma plus profonde gratitude à tout jamais, pour l'aide précieuse et les conseils judicieux qu'il m'a prodigués tout au long de cet humble travail. Encore grand merci.

Au professeur **AISSI Miriem** co-promotrice de cette étude. Qui m'a guidée et conseillée tout au long de la réalisation de ce travail, pour son encouragement et sa disponibilité sans limite. Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

J'exprime également ma gratitude et mes plus profonds remerciements au Prof. Dr. **Honoris Causa SANTIAGO MAS-COMA** du Département Parasitologia « Facultad de Farmacia Universitat de València » d'avoir accepté de me recevoir dans son laboratoire, pour ses conseils et ses longues discussions concernant le monde de la parasitologie

A Monsieur **HAMRIOUI Boussad** professeur de parasitologie au CHU Mustapha PACHA qui nous a accueillis et permis de manipuler au sein de son laboratoire. Merci professeur.

A Madame **ZAIT Houria** Maitre de Conférene Classe « A » de parasitologie au CHU Mustapha PACHA pour sa présence et son aide lors de mes manipulations au CHU-Mustapha PACHA et d'avoir bien voulu accepter d'être membre de ce jury.

J'exprime également ma gratitude au Professeur **MILLA Amel** de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger d'avoir accepté de présider ce travail.

J'exprime également ma gratitude au Docteur **LAATAMNA Abdelkarim** Maitre de Conférence Classe « A » à l'Université Ziane ACHOUR de Djelfa ; au Docteur **MOULOUA Abdekamel** Maitre de Conférene Classe « A » à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou et au Docteur **BAROUDI Djamel** Maitre de Conférene Classe « A » de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger d'avoir accepté d'être membres de ce jury.

Je remercie **Sarra FARJALLAH**, Maitre assistant à Research Unit of Integrative Biology and Evolutionary and Functional Ecology of Aquatic Systems, Faculty of Science of Tunis, University of Tunis El Manar, Tunis, Tunisia pour son aide précieuse pour la réalisation de la biologie moléculaire et sa disponibilité et ce, malgré la distance.

Je remercie **Nabil AMOR**, Maitre Assistant au KSU Mammals Research Chair, Department of Zoology, College of Science, King Saud University et Research Unit of Integrative Biology and Evolutionary and Functional Ecology of Aquatic Systems, Faculty of Science of Tunis, University of Tunis El Manar, Tunis, Tunisia d'avoir accepté et financé la réalisation de la partie biologie moléculaire. merci encore

Mes remerciements vont également au Dr **María Dolores BARGUES Castelló** du DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA « Facultad de Farmacia Universitat de València » de m'avoir également accueillie dans son laboratoire et m'a permis d'apprendre toutes les techniques en biologie moléculaire.

A **Patricio ARTIGAS** maitre assistant DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA  
« Facultad de Farmacia Universitat de València » de m'avoir aidé et accompagné lors de  
toutes mes manipulations au sein de son laboratoire pour sa gentillesse sa disponibilité sans  
limite, merci encore.

Aux vétérinaires praticiens des abattoirs qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de  
ce travail.

Que tous ceux qui ont participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail y trouvent mes  
remerciements les plus sincères.

## *Dédicaces*

*« Le génie commence les beaux ouvrages, mais le travail seul les achève. »*

*A tous ceux qui m'ont aidée à élaborer ce travail.*

*Je dédie tout mon travail à mes chers et adorables parents « maman et papa »*

*Maman Je ne saurais exprimer des dédicaces qui seront à la hauteur de mon amour pour toi et de l'importance que tu occupes dans ma vie, aucune mère n'a apporté autant d'amour d'affection et de soutien à l'égard de son enfant que toi tu l'as fait, tu as toujours été présente pour chaque partie réalisée dans ce travail « je t'aime fort maman », tu es à ton tour ma vie mon rayon de soleil. je ne saurais imaginer l'achèvement de ce travail sans toi.*

*A papa, le pilier sur lequel j'ai toujours compté dans ma vie, aucune dédicace ne saurait également exprimer mon amour et ma gratitude pour tes conseils, ton orientation et ta disponibilité tout au long de ce précieux travail, sans oublier ta contribution directe en tant qu'accompagnateur pour tous les prélèvements réalisés durant cette étude comme un véritable assistant qui au chemin a appris beaucoup du domaine et qui a su m'encourager à chaque moment difficile « je t'aime papa ».*

*Ce travail je le dédie également à mes deux promoteurs Monsieur HARHOURA et madame AISSI, qui en plus de leur encadrement ont réussi à prendre une place spéciale dans ma vie et que je considère aujourd'hui comme mes deuxièmes parents aucune dédicace ne saurait également exprimer tout l'amour et l'affection que je vous porte, à mon tour maintenant d'être là pour vous.*

*A mon cher fiancé, complice et confident Lamara, aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entourée, trouve dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide et ta patience avec moi que ce travail a pu voir le jour, Que dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur.*

*A ma très chère tante adorée Rosa, aucune dédicace ne saurait t'exprimer mon profond attachement et amour, toujours là pour me guider m'encourager et montrer le bon chemin à suivre comme tu sais très bien le dire « Linda ton meilleur ami c'est ton livre » ainsi grâce à tes conseils j'ai abouti à pleins de succès « je t'aime Tata »*

*A Kamelia, Lila et Rima, ce que mes parents m'ont offert de mieux.*

*Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez, pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de donner dans ma vie. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorde santé, longue vie et bonheur avec vos maris et vos enfants*

*A mes très chers grands parents mamah et djeddi pour tout l'amour qu'ils m'apportent.  
Que dieu vous garde et vous préserve*

*A mes amis, qui sont la famille que j'ai choisie, qui m'apportent bonheur et réconfort avec une pensée particulière à « Tinhinane »*

## Tables des matières

Résumé	
Remerciements	
Dédicaces	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Abréviations	
Introduction .....	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
<i>A*Fasciola hepatica</i>	
I. Etude de <i>FASCIOLA HEPATICA</i> .....	7
I.1. Historique .....	7
I.2. Position systématique .....	8
I.3. Morphologie des différents stades du parasite .....	9
I.3.1. L'œuf .....	9
I.3.2- Le miracidium .....	9
I.3.3- Sporocyste .....	10
I.3.4- Rédie .....	10
I.3.5- Cercaire .....	10
I.3.6- Métacercaire .....	11
I.3.7- Forme adulte .....	11
I.4. Cycle Evolutif de <i>Fasciola Hepatica</i> .....	12
I.4.1. L'infestation de l'hôte définitif .....	13
I.4.2. Infestation du milieu extérieur .....	14
I.4.3. Infestation de l'hôte intermédiaire .....	15
I.4.4. Evolution de la cercaire dans le milieu extérieur .....	15
II. Epidémiologie.....	15
II.1. Répartition géographique de <i>Fasciola hepatica</i> .....	15
II.1.1. Distribution de <i>Fasciola hepatica</i> dans le monde.....	15
II.1.2 Distribution de <i>Fasciola Hepatica</i> en Algérie .....	16
II.2. Espèces affectées .....	17
II.2.1. l'hôte définitif .....	17
II.2.2. Hôte intermédiaire .....	17
II.3. Sources et la résistance du parasite et les modalités d'infestation.....	17
II.3.1. Sources du parasite.....	17
II.3.2. Résistance du parasite .....	18
II.4. Hôte intermédiaire ( <i>Galba Truncatula</i> ).....	19

II.4.1. Position systématique.....	19
II.4.2. La distribution mondiale de la limnée <i>Galba Truncatula</i> .....	20
II.4.3. Présentation du mollusque .....	21
II.4.4. Habitat du mollusque .....	22
II.4.5. Infestation des bovins.....	23
II.4.5.1. Infestation au printemps .....	23
II.4.5.2. l'Infestation de début d'Eté .....	24
II.4.5.3. Infestation de fin d'Eté –Automne .....	24
II.5. Facteurs favorisants .....	24
II.5.1. Facteur eau et la nature du sol.....	25
II.5.2. Conditions climatiques.....	25
II.5.3. Mode d'élevage.....	25
III. Prévalence de la fasciolose .....	25
III.1. Prévalence de la fasciolose dans le monde .....	25
III.1.1. Prévalence de la fasciolose animale .....	26
III.1.2. Prévalence de la fasciolose humaine .....	27
III.2. Prévalence de la fasciolose en Algérie .....	28
III.2.1. Prévalence de la fasciolose animale en Algérie.....	28
III.2.2. Prévalence de la fasciolose humaine en Algérie .....	28
IV. Impact économique de la fasciolose .....	30
IV.1. Importance médicale .....	31
IV.2. Impact zootechnique .....	31
IV.2.1. Fertilité et production du lait .....	32
IV.2.2. Production de la viande .....	33
IV.2.3. Saisies des foies .....	33
V. Signes cliniques et lésions .....	34
V.1. Chez l'animal .....	34
V.2. Chez l'homme .....	34
VI. Immunité.....	38
VI.1. Réponses immunitaires à l'infestation par <i>Fasciola hepatica</i> .....	38
VI.1.1. Immunité non spécifique .....	38
VI.1.2. Immunité spécifique à médiation humorale et cellulaire .....	39
VI.1.2.1. Réponse humorale .....	39
VI.1.2.2. Immunité à médiation cellulaire .....	39
VI.2. Echappement du parasite à la réaction immunitaire .....	41

VII. Diagnostic de la fasciolose .....	41
VII.1. Diagnostic clinique .....	41
VII.2. Inspection des foies .....	42
VII.3. Diagnostic coproscopique .....	42
VII.3.1. Sédimentation.....	44
VII.3.2. Flottation méthode de JANECKSO et URBANYI (1931) .....	44
VII.4. Tests immunologiques (diagnostic immunologique) .....	45
VII.4.1. L'hémagglutination indirecte (H.A.I) .....	46
VII.4.2. Immunofluorescence indirect (IFI) .....	46
VII.4.3. L'ELISA (Enzyme Linked Sorbent Assay) .....	47
VII.4.4. L'immunoélectrophorèse (I.E.P) .....	50
VII.5. Diagnostic moléculaire .....	51
VIII. Traitement et résistance anthelminthique .....	52
IV. Développement du vaccin .....	54

**B\**Dicrocoelium Dendriticum (Lanceolatum )***

I. Présentation du parasite : <i>Dicrocoelium dendriticum</i> .....	56
I-1. Place dans la systématique.....	56
I.2. Morphologie de l'adulte .....	57
I.3. Biologie .....	58
I.3.1. Habitat .....	58
I.3.2. Nutrition .....	58
I.3.3. Cycle évolutif .....	59
II. Epidémiologie.....	65
II.1. Répartition géographique .....	65
II.2. prévalence .....	66
III. La symptomatologie .....	66
III.1. La forme chronique .....	67
III.2. le contexte puerpéral .....	67
IV. Diagnostic .....	68
IV.1. Diagnostic clinique (Ante –mortem).....	68
IV.2. Diagnostic nécropsique (poste –mortem) .....	69
IV.3. Diagnostic coprologique: (voir partie <i>Fasciola hepatica</i> ) .....	69
IV.4. La recherche des œufs de <i>Dicrocoelium dendriticum</i> dans la bile.....	70
IV.5. La sérologie .....	71
V. Prophylaxie et traitement.....	72

## CHAPITRE II : Matériels et méthodes

I. Matériel et méthodes .....	75
I.1.Présentation de la zone d'étude.....	75
I.2.Le choix des animaux prélevés .....	81
I.2.1.Identification des animaux .....	81
I.2.2.Outils statistiques .....	81
I.2.3.Prélèvements .....	81
I.2.3.1.Prélèvements de selles .....	81
I.2.3.2.Prélèvements de la bile .....	82
I.2.3.3.Prélèvements sanguins.....	82
I.2.3.4.Prélèvements du parasite .....	83
I.3.Méthodes de Diagnostic .....	83
I.3.1.Inspection des foies à l'abattoir .....	83
I.3.2.Analyses des matières fécales (analyses coprologique) .....	84
I.3.3.Analyses de la bile .....	85
I.3.4.Analyses histologiques des parasites ( <i>Dicrocoelium dendriticum</i> ) .....	85
I.3.5.Analyses sérologiques .....	87
I.3.5.1.Principe du test .....	87
I.3.5.2. Composition de la trousse .....	89
I.3.5.3.Mode opératoire .....	89
I.3.5.4. Interprétation des résultats .....	93
I.3.6.Analyses moléculaires de <i>Fasciola spp</i> .....	94
CHAPITRE III : Résultats.....	106
<b>1ère partie : Résultats de la fasciolose à <i>Fasciola hepatica</i> .....</b>	<b>107</b>
I-Prévalence totale de la fasciolose à <i>Fasciola hepatica</i> .....	107
I.1.Prévalence totale selon les localités (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaïa) .....	108
II. Résultats des différentes techniques de diagnostic .....	109
II.1.Inspection des foies au niveau des abattoirs (des trois wilayas).....	109
II.1.1Prévalence selon les localités (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaïa) .....	110
II.2.Résultats de l'analyse coprologique (des trois wilayas) .....	111
II.2.1.Prévalence selon les localités (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaïa) .....	111

II.3.Résultats de l'analyse de la bile (des trois wilayas) .....	112
II.3.1 Prévalence selon les localités (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaïa) .....	112
II.4.Résultats de l'analyse sérologique des sérums de bovins positifs et les douteux, et quelques négatifs (sur 675 sérums bovins) .....	114
II.4.1.Résultats de la sérologie .....	114
II.4.2.Etude des facteurs de risque de la variation des taux d'anticorps.....	114
II.4.2.1.Variation des taux d'anticorps selon la localité .....	114
II.4.2.2.Variation des taux d'anticorps selon la saison de l'année..	115
II.4.2.3.Variation des taux d'anticorps selon le sexe de l'animal.....	116
II.4.2.4.Variation des taux d'anticorps selon l'âge de l'animal .....	117
II.4.2.5.Variation des taux d'anticorps selon la race de l'animal..	118
II.4.2.6.Relation entre le degré de l'infestation à l'inspection des foies et les taux d'anticorps révélés en ELISA .....	119
II.5.Résultats de l'analyse moléculaire .....	121
III. Etude des facteurs de risques de la distomatose hépatique à <i>Fasciola hepatica</i> .....	140
III.1.Facteur sexe .....	140
III.2.Facteur âge .....	141
III.3.Facteur saison .....	142
III.4.Facteur race .....	143
<b>Partie II : Résultats de la Dicrocéliose à <i>Dicroelium</i> sp</b> .....	145
I. Prévalence totale de la dicrocéliose .....	145
I.1.Résultats de l'inspection des foies au niveau des abattoirs .....	147
I.2.Résultats de l'analyse de la bile .....	147
I.3.Résultats de l'analyse coprologique .....	148
II. Prévalence de la dicrocéliose bovine au niveau des différentes wilayas .....	148
II.1. Wilaya de Tizi-Ouzou .....	148
II.2 .Wilaya de Bouira .....	148
II.3.Wilaya de Béjaïa.....	149
III. Facteurs de risque.....	149
III.1.Facteur de saison .....	149
III.2.Facteur d'âge.....	150
III.3.Facteur sexe .....	150
IV. Résultats de l'analyse morphologiques.....	151

**Partie III- Co-infection et réaction croisée entre *Fasciola hepatica* et le *Dicrocoelium dendriticum***

I. Prévalence de la co-infection entre *Fasciola hepatica* et le *Dicrocoelium dendriticum*..154

II. Réaction croisée en Sérologie (ELISA) entre *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum* .....155

CHAPITRE IV : Discussion ..... 157

Conclusion.....176

Références bibliographiques .....178

Annexes .....217

## Listes des Figures

<b>Figure 1 :</b> classification de <i>Fasciola hepatica</i> .....	7
<b>Figure 2 :</b> Œuf de <i>Fasciola hepatica</i> . <b>A :</b> Aspect extérieur observé au microscope optique <b>B :</b> Représentation schématique de l'œuf .....	9
<b>Figure 3:</b> <b>A :</b> Miracidium de <i>Fasciola hepatica</i> . <b>B :</b> Représentation schématique du stade larvaire miracidium .....	9
<b>Figure 04 :</b> Morphologie du stade larvaire sporocyste de <i>Fasciola hepatica</i> . <b>A :</b> Représentation schématique d'un sporocyste de <i>Fasciola hepatica</i> .....	10
<b>Figure 05 :</b> Morphologie de la rédie de <i>Fasciola hepatica</i> <b>A :</b> Représentation schématique du stade larvaire rédie . <b>B :</b> Rédie sous microscope optique de <i>Fasciola hépatica</i> .....	10
<b>Figure 6 :</b> Schéma de larve cercaire de <i>F.hepatica</i> .....	11
<b>Figure 07 :</b> Morphologie su stade larvaire métacercaire. <b>A :</b> Représentation schématique de la metacercaire (Bhamrah et Juneja ,1999). <b>B :</b> métacercaires sur un support végétale .....	11
<b>Figure 8:</b> Aspect morphologique de <i>Fasciola hepatica</i> <b>A :</b> Appareil génital et digestif de <i>Fasciola hepatica</i> <b>B :</b> <i>Fasciola hepatica</i> adulte.....	12
<b>Figure 9 :</b> Cycle de vie de la grande douve du foie, <i>Fasciola hepatica</i> .....	13
<b>Figure 10 :</b> Cholangite chronique .....	14
<b>Figure 11 :</b> Schéma illustrant les deux alternatives concernant la migration des douves juvéniles pour atteindre le parenchyme hépatique .....	14
<b>Figure 12 :</b> Classification de la <i>lymnaea truncatula</i> (hôte intermédiaire de <i>Fasciola hepatica</i> ) .....	19
<b>Figure 13:</b> Localisation géographique de <i>L. truncatula</i> (en carré rouge) .....	21
<b>Figure 14:</b> <i>Lymnaea truncatula</i> .....	22
<b>Figure 15:</b> Signe de bouteille chez les ovins .....	35
<b>Figure 16:</b> Mécanismes d'échappement immunitaire de <i>F. hepatica</i> .....	40
<b>Figure 17 :</b> Principe de la technique immunologique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) .....	48

<b>Figure 18 : A/</b> Micrographies claires de <i>Dicrocoelium chinensis</i> (à gauche) et de <i>D. dendriticum</i> (à droite) marqués au carmin. Avec mise en évidence de la taille globale et l'orientation des testicules. <b>B/</b> <i>Dicrocoelium hospes</i> Looss, 1907. Face ventrale .....	58
<b>Figure 19 :</b> Cycle évolutif de <i>Dicrocoelium lanceolatum</i> .....	59
<b>Figure 20:</b> <i>D. dendriticum</i> : œuf operculé contenant du miracidium (MI) avec deux boules germinales (GB) .....	60
<b>Figure21 : A)</b> <i>D. dendriticum</i> : sporocyste fille contenant des cercaires. <b>B)</b> sporocystes filles avec cercaires en maturation.....	60
<b>Figure 22:</b> A) <i>D. dendriticum</i> : détail de la cercaire avec le développement de la queue et des ventouses orales et ventrales. <b>B)</b> <i>Ceruellia virgata</i> avec des boules de bave nouvellement excrétées .....	61
<b>Figure 23:</b> Fourmi se nourrissant de boules de bave.....	61
<b>Figure 24 :</b> Aspect des coquilles des différents mollusques intervenant dans le cycle de <i>Dicrocoelium lanceolatum</i> .....	64
<b>Figure 25 :</b> <i>Formica fusca</i> .....	65
<b>Figure26 :</b> Foie ovin infecté par <i>Dicrocoelium dendriticum</i> . Le parenchyme s'est durci à la suite d'une fibrose grave et d'une calcification. Des conduits épaissis sont également présents.....	69
<b>Figure 27 :</b> Carte géographique de la zone d'étude (Bouira,Tizi-Ouzou,Béjaia) .....	76
<b>Figure 28:</b> Carte géographique Tizi-Ouzou .....	77
<b>Figure 29 :</b> Carte de la wilaya de Béjaia .....	78
<b>Figure 30 :</b> Carte de la wilaya de Bouira .....	79
<b>Figure 31 :</b> Carte géographique de l'Algérie (a). Bejaïa (b). Nord de l'Algérie.....	80
<b>Figure 32 :</b> Prélèvements de matières fécales à partir du rectum dans des boîtes en plastiques.....	82
<b>Figure 33:</b> prélèvement de la bile par ponction de la vésicule biliaire .....	82
<b>Figure 34 :</b> Centrifugation du sang récolté dans des tubes secs et conservation des sérums au congélateur dans des tubes Eppendorfs.....	84
<b>Figure 35:</b> prélèvement du parasite et lavage au PBS.....	83
<b>Figure 36:</b> Inspection des foies par la réalisation des incisions obligatoires .....	84
<b>Figure 37:</b> Réalisation de l'étape de circulation dans l'Autotechnicon .....	87

<b>Figure 38</b> : Inclusion en paraffine ou enrobage .....	87
<b>Figure 39</b> : Etalement des coupes dans un bain thermostaté (40°) .....	87
<b>Figure 40</b> : Coloration des lames par la méthode hémateïne-éosine.....	87
<b>Figure41</b> : Disposition des différents enchantions de sérums sur les plaques ELISA .....	88
<b>Figure42</b> : Photo des constituants du kit ELISA .....	91
<b>Figure43</b> : plaque ELISA <i>Fasciola hepatica</i> .....	91
<b>Figure44</b> : Dilution des sérums sanguins au 1/100 dans le tampon de dilution.....	91
<b>Figure 45</b> : Les sérums positif et négatif ainsi que le traceur.....	91
<b>Figure46</b> : Plaque couverte de film adhésif et laisser incuber pendant 1heure .....	92
<b>Figure47</b> :A/ laveur automatique (Bio-RAD) ,B/ flacon de la solution de lavage.....	92
<b>Figure 48</b> : Diluer au 1/50 le conjugué dans le tampon de dilution .....	91
<b>Figure 49</b> : Distribution du révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits et incubation 10 minutes à 21°C +/- 3°C à l'obscurité et sans couvrir .....	92
<b>Figure 50</b> : Distribution de la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune .....	92
<b>Figure51</b> : Enregistrement des densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques.....	93
<b>Figure 52</b> : Mesure morphométrique des douves récoltées au niveau des différentes localités à l'aide d'un pied à coulisse .....	95
<b>Figure 53</b> : Unité de transcription d'ADNr d'eucaryote avec son espaceur non transcrit. NTS: Non Transcribed Spacer, espaceur non transcrit; ETS: External transcribed spacer, espaceur externe transcrit; ITS: Internal transcribed spacer, espaceur interne transcrit, 18S, 5,8S et 28S correspondent aux gènes codant pour les sous-unités ribosomiques correspondantes ( Hillis et Dixon, 1991) .....	96
<b>Figure 54</b> : Le génome mitochondrial de <i>Fasciola</i> sp .....	97
<b>Figure 55</b> :A/ coupe de la partie de la zone latérale de la douve adulte .B/Filament d'un brin d'ADN après extraction (photos Chougar L., 2018) .....	98

<b>Figure 56</b> : Schéma représentatifs des différents mixtes utilisés pour l'amplification des (ITS ,NAD1 ,COI et COI-trnT-rnL) .....	99
<b>Figure 57</b> : Mise pour amplification des différents mixtes dans le thermocycleur .....	100
<b>Figure 58</b> : <b>A</b> : dépôt de l'ADN dans le gel d'agarose <b>B</b> : photographie de la migration .....	102
<b>Figure 59</b> : kiste de purification de l'ADN (mi-PCR Purification Kit, metabion) .....	103
<b>Figure 60</b> : Tubes de purification d'ADN.....	103
<b>Figure 61</b> : Eppendorf BioPhotometer pour la quantification de l'ADN.....	104
<b>Figure 62</b> : Secteur 3D représentant la Prévalence totale de la fasciolose au niveau des trois wilayas.....	107
<b>Figure 63</b> : Secteur 3D représentant la Prévalence totale de la fasciolose au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou.....	108
<b>Figure 64</b> : Secteur 3D représentant la Prévalence totale de la fasciolose au niveau de la wilaya de Bouira .....	108
<b>Figure 65</b> :Secteur 3D représentant la Prévalence totale de la fasciolose au niveau de la wilaya de Béjaia.....	109
<b>Figure 66</b> :Photos présentant des foies atteints de la fasciolose .....	110
<b>Figure 67</b> :Œufs de <i>Fasciola hepatica</i> dans la bile (GX 400) .....	112
<b>Figure 68</b> : Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon la localité .....	115
<b>Figure 69</b> : Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon la saison de l'année .....	116
<b>Figure 70</b> : Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon le sexe de l'animal .....	117
<b>Figure 71</b> : Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon l'âge de l'animal.....	118
<b>Figure 72</b> : Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon la race de l'animal.....	119

<b>Figure 73 :</b> Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon les résultats de l'inspection des foies .....	121
<b>Figure 74:</b> Réseau d'haplotype obtenu à partir des séquences COI-trnT-rrnL (a), COI (b) et NADI (c). L'aire de chaque cercle est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype et chaque branche représente une mutation.....	128
<b>Figure 75:</b> Mismatch Distribution pour tester l'expansion des isolats de <i>F. hepatica</i> . Le nombre de différences de nucléotides entre les paires de séquences est indiqué en abscisse et leur fréquence en ordonnée. COI-trnT-rrnL (a), COI (b) et NADI (c).....	135
<b>Figure 76:</b> Arbres de consensus construits avec la méthode ML montrant les relations phylogénétiques entre <i>F. hepatica</i> et <i>F. gigantica</i> . Phylogénie déduite des séquences COI (a), NADI (b) et COI-trnT-rrnL (c). Les nombres affichés aux nœuds des branches sont des valeurs bootstrap. <i>Fascioloides magna</i> (COI, NADI et COI-trnT-rrnL) a été utilisé comme groupe externe .....	139
<b>Figure 77:</b> Histogramme représentant l'atteinte fasciolienne selon le sexe de l'animal.....	141
<b>Figure 78:</b> Histogramme représentant l'atteinte fasciolienne selon la classe d'âge des animaux .....	142
<b>Figure 79:</b> Histogramme représentant l'atteinte fasciolienne selon la saison de l'année .....	143
<b>Figure 80:</b> Histogramme représentant l'atteinte fasciolienne selon la race de l'animal .....	144
<b>Figure 81:</b> Adulte de <i>Dicrocoelium dendriticum</i> observe sous la loupe (2: ventouse buccale, 1: Utérus, 3: ventouse ventrale) avec un corps translucide .....	145
<b>Figure 82:</b> Nombreux œufs de <i>Dicrocoelium dendriticum</i> dans la bile et les matières fécales observés au microscope optique (Gr. X 1000) .....	152
<b>Figure 83:</b> Coupe histologique d'un adulte de <i>Dicrocoelium dendriticum</i> (Cp: poche de Cirre, Os: ventouse buccale, Vs: ventouse ventrale, T: testicules, Ov: ovaire, Ot: Ootype, Ph: pharynx, U: utérus rempli d'œufs bruns du parasite ,Teg: Son tégument est lisse.....	153
<b>Figure 84 :</b> Photos représentant des co-infections à <i>Fasciola hepatica</i> et <i>Dicrocoelium dendriticum</i> avec présence des œufs des deux parasite dans la bile et les matières fécales.....	155

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I :</b> Les événements les plus importants concernant la description et la découverte du cycle de vie de <i>Fasciola hepatica</i> .....	7
<b>Tableau II:</b> La fourchette de prévalence globale (%) de la fasciolose chez les ruminants signalée dans les différents continents de 2000 à 2015 .....	16
<b>Tableau III :</b> Différentes espèces de mollusques hôtes intermédiaires de la fasciolose .....	20
<b>Tableau IV :</b> Caractéristiques des quatre cas de distomatose humaine à <i>F. hepatica</i> . HES (hyperéosinophilie sanguine), IEP (immunoélectrophorèse), PZQ (praziquantel) .....	38
<b>Tableau V.</b> Résumé des tests ELISA de détection d'anticorps disponibles dans le commerce pour le diagnostic de <i>Fasciola hepatica</i> chez les bovins .....	45
<b>Tableau VI.</b> Rapports publiés par des pairs sur le TCBZ-R chez les moutons en Europe ...	53
<b>Tableau VII:</b> Différents constituants du kit ELISA .....	89
<b>Tableau VIII:</b> Tableau déterminant les différents niveaux de positivité des sérums .....	94
<b>Tableau IX :</b> Amorces utilisées pour l'amplification de COI-trnT-rrnL .....	99
<b>Tableau X:</b> différentes amorces utilisées pour l'amplification de COI,NADI ,ITS-1-2.....	99
<b>Tableau XI:</b> cycles de réaction utilisées pour l'amplification de COI, NADI, ITS et COI-trnT-rrnL.....	101
<b>TableauXII :</b> Résultats de l'inspection des foies au niveau des abattoirs (des trois wilayas) .....	109
<b>Tableau XIII:</b> Résultats de l'inspection des foies au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou... ..	110
<b>Tableau XIV:</b> résultats de l'inspection des foies au niveau de la wilaya de Bouira .....	110
<b>Tableau XV:</b> résultats de l'inspection des foies au niveau de la wilaya de Bejaia.....	111
<b>Tableau XVI:</b> Résultats de l'analyse coprologique au niveau des trois wilayas .....	111
<b>Tableau XVII:</b> résultats de l'analyse coprologique au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou... ..	111
<b>Tableau XVIII :</b> résultats de l'analyse coprologique au niveau de la wilaya de Bouira.....	112
<b>Tableau XIX:</b> résultats de l'analyse coprologique au niveau de la wilaya de Bejaia.....	112
<b>TableauXX :</b> Résultats de l'analyse de la bile (des trois wilayas).....	113

<b>Tableau XXI:</b> Résultats de l'analyse de la bile au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou .....	113
<b>Tableau XXII:</b> Résultats de l'analyse de la bile au niveau de la wilaya de Bouira .....	113
<b>Tableau XXIII:</b> Résultats de l'analyse de la bile au niveau de la wilaya de Bejaia.....	113
<b>Tableau XXIV:</b> Nombre de bovins abattus et prévalence des foies infectés par la fasciolose dans les wilayates d'Algérie.....	122
<b>Tableau XXV :</b> Résultats de l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA) pour la largeur, la longueur et le rapport longueur et largeur du corps. Les groupes correspondent aux provinces de l'est et de l'ouest.....	123
<b>Tableau XXVI :</b> Détails des séquences ITS de Fasciola d'Algérie et d'autres pays .....	124
<b>Tableau XXVII :</b> Analyse de la variance moléculaire (AMOVA).....	127
<b>Tableau XXVIII:</b> Détails des séquences COI-trnT-rnL de Fasciola d'Algérie et d'autres pays .....	127
<b>Tableau XXIX:</b> Détails des séquences de Fasciola COI d'Algérie et d'autres pays .....	130
<b>Tableau XXX :</b> Détails des séquences NADI Fasciola d'Algérie et d'autres pays .....	133
<b>Tableau XXXI :</b> Test de neutralité de Tajima's D et Fu's FS .....	135
<b>Tableau XXXII:</b> Tableau représentant l'atteinte fasciolienne selon le sexe de l'animal .....	140
<b>Tableau XXXIII:</b> Tableau représentant l'atteinte fasciolienne selon la classe d'âge des animaux .....	141
<b>TableauXXXIV:</b> Tableau représentant l'atteinte fasciolienne selon la saison de l'année.. ...	143
<b>Tableau XXXV:</b> Tableau représentant l'atteinte fasciolienne selon la race de l'animal.....	144
<b>TableauXXXVI:</b> La prévalence totale de la dicrocélie au niveau des trois wilayas.....	145
<b>Tableau XXXVII:</b> Résumé des 21 bovins positifs à la dicrocélie .....	146
<b>Tableau XXXVIII:</b> Résultats de l'analyse coprologique .....	147
<b>Tableau XXXIX:</b> Résultats de l'analyse de la bile.....	147
<b>Tableau XXXX:</b> Résultats de l'inspection des foies au niveau des abattoirs.....	148
<b>Tableau XXXXI:</b> Résultats de l'inspection des foies, analyse de la bile et la coprologie (Tizi-Ouzou).....	148

<b>Tableau XXXXII:</b> Résultats de l'inspection des foies, analyse de la bile et la coprologie (Bouira) .....	149
<b>Tableau XXXXIII:</b> Résultats de l'inspection des foies, analyse de la bile et la coprologie (Bejaia) .....	149
<b>Tableau XXXXIV:</b> Positivité des bovins selon le facteur saison .....	150
<b>Table XXXXV:</b> Positivité des bovins selon le facteur âge .....	150
<b>Table XXXXVI:</b> Positivité des bovins selon le facteur sexe .....	150
<b>Tableau XXXXVII:</b> Données Morphométriques du <i>Dicrocoelium dendriticum</i> .....	151
<b>Tableau XXXXVIII:</b> Tableau représentatif de la co-infection par la <i>Fasciola hepatica</i> et <i>Dicrocoelium dendriticum</i> .....	154
<b>Tableau XXXXIX:</b> Tableau représentatif des 6 bovins co-infectés par la fasciolose et la dicrocoeliose.....	154
<b>Tableau XXXXX:</b> Tableau représentatif des résultats sérologiques des 21 bovins positifs à Dicrocoelium dont les 6 bovins co-infectés par la fasciolose et la dicrocoeliose .....	156

## LISTE DES ABREVIATIONS

% : pourcentage  
+/-: Résultat douteux.  
+: Infestation faible  
++: Infestation moyenne  
+++: Forte infestation  
° C : Degré Celsius  
**0**: Pas d'infestation par *Fasciola hepatica*  
**18S, 5,8S et 28S** : correspondent aux gènes codant pour les sous-unités ribosomiques correspondante  
**A** : Adénine  
**A.D.C.C : Citotoxicité Cellulaire Anticorps Dépendante**  
**AC** : Anticorps  
**ADN (DNA)** : acide désoxyribonucléique  
**ADNmt** : ADN mitochondriale  
**ADNr** : Acide désoxyribonucléique ribosomal  
**Ag** : Antigènes  
**AMOVA** : Analysis of molecular variance  
**ANOVA** : Analyse de la variance  
**ARNm** acide ribonucléique messenger  
**ARNr** :acide ribonucléique ribosomal  
**BET** : Bromure d'Ethidium  
**BL / BW** :Le rapport longueur / largeur du corps  
**BL** : La longueur du corps  
**BVD-MD** : Diarrhée virale bovine /maladie des muqueuses  
**BW** : la largeur du corps  
**C** : cytosine  
**C.H.U** : **Centre Hospitalier Universitaire**  
**CatLs** : cathepsines L protéases  
**CE** : Cercaires  
**CHOL+DIS-** : CHOLangite non DIStomienne  
**CHOL+DIS+** : CHOLangite DIStomienne  
**CL1** : la cathepsine native L1  
**cm** : centimètre  
**COI** : la cytochrome c oxydase  
**COI-trnT-rrnL** : Séquences nucléotidiques mitochondriales couvrant la région 3' du gène codant pour la protéine *cox1*, tous les ARN de transfert pour la thréonine (*trnT*), et la plupart des *rrnL* (16S rRNA) de *F. hepatica*.  
**D** : Dicrocoelium  
**ddNTP** : didésoxyribonucléoside (A, C, G, T) triphosphate  
**dNTP** : désoxyribonucléoside (A, C, G, T) triphosphate  
**DO** : Densité Optique  
**DS** : déviation standard  
**E / S** :produits excréteurs sécrétoires  
**EC1** : échantillon 1  
**EC2** : échantillon 2  
**EDTA** : éthylène diaminotétraacétique  
**EIA** : Enzyme Immuno Assays

**ELISA** : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
**ENSV** :Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire  
**E-S** : Excrétion-Sécrétion  
**ETS** espaceur externe transcrit (External Transcribed Spacer)  
**F.** :*Fasciola*  
**f2** : Protéine de surface de fasciola  
**FABP** : les protéines de liaison aux acides gras natives  
**FEC** : Nombre d'œufs fécaux  
**FECRT** :Test de réduction du nombre d'œufs fécaux  
**FLOTAC** : Technique de flottation  
**g** : gramme  
**G** : guanine  
**GB** :boules germinales  
**GST** : *Glutathion S-Transferase*  
**GSU** grande sous-unité  
**h** : heure  
**H.A.I** : hémagglutination indirecte  
**Hd** :La diversités d'haplotype  
**HES** : Hyperéosinophilie Sanguine  
**I.E.P** : immunoélectrophorèse  
**I.F.I** : immuno-fluorescence indirect  
**I.M.P** : Iodomercurate de Potassium  
**IES** : l'Immunoélectrophorèse Simple  
**Ig** : Immunoglobuline  
**IGS/NTS/IGR** : espaceur non transcrit des gènes d'ADNr (Intergenic spacer)  
**ITS** : espaceur interne transcrit des gènes d'ADNr  
**Kb**: kilo base  
**kDa** :Kilo dalton  
**Kg** : kilogramme  
**Km** :kilomètre  
**L** : litre  
**L1** : premier stade larvaire  
**L2** : deuxième stade larvaire  
**L3** : troisième stade larvaire  
**L4** : quatrième stade larvaire  
**LAMP** : Amplification isotherme à médiation en boucle  
**LAP** : Leucine aminopeptidase native  
**M** : molaire (concentration en mole/Litre)  
**ME** :métacercaires  
**Mg** : milligramme  
**MI** :miracidies  
**MI** :miracidium  
**min** :minute  
**ml** millilitre  
**ML** : maximum likelihood  
**mm** :millimètre  
**n** nombre  
**NADI** :NADH dehydrogenase subunit 1  
**NJ** :Les analyse de Neighbor joining  
**nm** : Nanomètre

**NO**: Monoxyde d'Azote  
**O.M.S** : Organisation Mondiale de la Santé  
**O.N.M** : Office National Météorologique  
**opg** :Œufs par gramme  
**P** : prévalence ou seuil de significativité (selon le contexte)  
**p.i** : post infestation  
**pb** :paire de bases  
**PBS** :Tampon phosphate salin  
**PCR** : Amplification in vitro de l'ADN (polymerase chain reaction)  
**PES** : produits d'excrétion-sécrétion  
**PM** : poids moléculaire  
**Pmol** : picomole  
**PZQ** :praziquantel  
**rpm** rotation par minute  
**sec** : seconde  
**So** :Les produits de sécrétion somatique  
**SP1, SP2** :sporocystes de première et deuxième générations  
**T** : thymine  
**T-** : Témoin négatif,  
**T+** : Témoin positif,  
**TBE** : Tris, Borate , EDTA  
**TCBZ** : triclabendazole  
**TCBZ-R** : résistances au TCBZ  
**TMB** : TetraMethylBenzidine  
**TR** : Traceur,  
**USD** : Dollar Americain  
**UV** : ultraviolet  
**V** : volt  
**VAL** : Valeurs  
**Wpi** : Semaines poste infection  
**ZAB** : Albendazole  
**µg** microgramme  
**µL** : microlitre  
**µm** : micromètre  
**π**: la diversité des nucléotides

*“In this very wormy world, parasites  
are the single largest component of  
biodiversity”  
Lyles an*

# *Introduction générale*

## Introduction

Les distomatoses sont des anthroponoses. L'atteinte de l'homme est accidentelle et occasionnelle. Selon l'organe infecté, on distingue les distomatoses hépatobiliaires, intestinales et pulmonaires. Dans cette présente étude, nous nous sommes intéressés aux distomatoses hépatobiliaires chez le bovin dues à *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* et *Dicrocoelium dendriticum*.

La Dicrocœliose est causée par un Trématode, Dicrocoeliidae appelé petite douve du foie ou *Dicrocoelium* spp. Il existe de nombreuses espèces de *Dicrocoelium* (Dujardin, 1845), vivant dans les canaux biliaires et la vésicule biliaire des animaux domestiques et sauvages. Les espèces les plus importantes sont : *Dicrocoelium dendriticum* Rudolphi, 1819, *D. hospes* Looss, 1907, *D. chinensis* Tang et Tang, 1978, et *D. suppereri* (Hinaiday, 1983) (syn. *D. orientalis* (Sudarikov et Ryjkiiov, 1951).

La petite douve du foie, (*Dicrocoelium dendriticum*), longtemps considérée comme une forme immature de *Fasciola hepatica*, fait intervenir un mollusque gastéropode comme premier hôte intermédiaire et une fourmi comme second hôte intermédiaire dans son cycle de vie. Les sporocystes et les cercaires, vivent dans l'hépatopancréas des escargots terrestres quant aux métacercaires, vivent dans l'abdomen et le cerveau des fourmis (second hôte intermédiaire).

Le parasite mesurant 8-14 / 2-2,5 mm présente une légère spécificité de l'hôte définitif, avec une préférence pour les ruminants qui peuvent être considérés comme les vrais hôtes originaux, parmi lesquels on trouve principalement les moutons et les chèvres, et secondairement les grands ruminants comme les bovins (Mas-Coma et al., 1997).

La petite taille et la plasticité du *Dicrocoelium* lui permettent de se rendre au plus profond des voies biliaires, dans les plus fines ramifications. Cette localisation en profondeur semble préférentielle chez les bovins (Alzieu et al., 1996). Le parasite peut également se trouver à la sortie du pancréas, au niveau du canal pancréatique (Ducháček et Lamka, 2003). Des localisations erratiques, extra biliaires, notamment dans les centres nerveux, restent très rares (Euzeby, 1971a).

En Algérie un seul rapport de cas d'abattoir a rapporté la présence de la dicrocœliose dans la région de la Mitidja (Chaouadi et al., 2018). En revanche le nombre de rapports

sur la dicrocœliose augmente de plus en plus dans d'autres pays en raison de l'expansion des habitats secs et des parasites devenant résistants aux antihelminthiques (Gürelli, 2017).

Des études récentes sur la dicrocœliose montrent que sa présence est sans doute sous-estimée chez les ruminants. Cette maladie semble causer des troubles plus ou moins graves, pouvant parfois conduire à la mort de l'animal (Baudin M., 2005).

La fasciolose ou grande douve du foie est une zoonose due à un trématode hématophage causée par deux espèces de *Fasciola* : *Fasciola hepatica* et *Fasciola gigantica*. La fasciolose à *Fasciola gigantica* a été signalé dans les zones tropicales, tandis que *F. hepatica* se caractérise par une répartition mondiale (Mas-Coma et Bargues, 1997). Un diagnostic précis de la fasciolose est toujours une tâche difficile pour les praticiens du terrain.

Parmi les trématodoses d'origine alimentaire soulignées dans la récente feuille de route de l'O.M.S. pour les maladies tropicales négligées 2020 (World Health Organization et al., 2013), la fasciolose représente une place spécifique en raison de sa distribution mondiale, de son émergence et du nombre important de personnes infectées (Mas-Coma S. et al., 2009a). L'impact du changement climatique sur la fasciolose est lié à la forte dépendance à la fois des stades larvaires fasciolaires et de leurs vecteurs escargots (lymnée d'eau douce) avec les caractéristiques climatiques et environnementales (Mas-Coma et al., 2009b, Fuentes et al., 1999, Fuentes et al., 2001). L'incidence économique de la fasciolose bovine est très grande en considérant les pertes pondérales, pertes de lait et les saisies de foies parasités aux abattoirs en zones endémiques (Wamae et Ihiga, 1991), (Nyindo and Lukumbagire, 2015). L'organisation mondiale de la santé a estimé à 2,4 millions le nombre de personnes infectées dans le monde, la prévalence étant la plus élevée dans les pays en développement (Mehmood et al., 2017).

En comparant les carcasses d'animaux sains à celles d'animaux parasités par *Fasciola*, les pertes en viande sont estimées à 25% du poids des témoins (Vissoh, 1980). Sur le plan épidémiologique, en Algérie toutes les conditions favorables au déroulement du cycle parasitaire de *F. hepatica* sont réunies. La fasciolose animale est connue depuis de longues dates. En effet, des prévalences chez les ovins et les bovins réunis, ont été rapportées, 12% à Constantine, 3% dans l'Algérois et 1% à Oran (Lievre., 1932). Une

étude menée par Mekroud et *al.*, (2004) montre que la prévalence de l'infestation naturelle est de 27 % chez les bovins à l'abattoir de Jijel de 1994 à 1996 alors qu'elle est seulement de 9,1% à Constantine sur la même période. Selon les Services vétérinaires algériens, les conséquences de la fasciolose animale sont importantes. En 2003, les abats de 5 364 bovins, de 2 642 ovins et de 335 caprins ont été retirés de la vente (Statistiques Nationales du Ministère de l'Agriculture, 2003). L'absence de traçabilité et les transhumances répétées ne permettent pas de déterminer avec précision le taux d'infestation chez le bétail par région ou sur tout le territoire national.

*Fasciola hepatica* est répandu en Afrique du Nord (Mekroud et *al.*, 2004 ;Farjallah et *al.*, 2009; Amor et *al.*, 2011; Ouchene-Khelifi et *al.*, 2018). L'Égypte est le seul pays du Nord de l'Afrique où *Fasciola* spp. et leurs hybrides aspermiques ont été décrits (Amer et *al.*, 2016). L'humidité du nord de l'Algérie favorise la survie de l'hôte intermédiaire *Galba truncatula* Müller, 1774 (Mekroud et *al.*, 2004; Righi et *al.*, 2016). La prévalence de la fasciolose aurait varié de 6,5 à 18,2% chez les ovins et de 9,1 à 27% chez les bovins (Mekroud et *al.*, 2004; Ouchene-Khelifi et *al.*, 2018). Ouchene-Khelifi et *al.*, (2018) ont signalé la saisie de plus de 3 000 foies infestés par la douve dans la région d'El Tarf, ce qui correspond à une perte économique de 60 000 euros.

L'identification traditionnelle des espèces est basée sur les caractères phénotypiques des vers adultes, tels que la largeur et la longueur du corps (Valero et *al.*, 2016). Cependant, plusieurs études ont révélé que les différences morphologiques pourraient être biaisées en raison de la présence de formes intermédiaires (Shafiei et *al.*, 2014). De plus, Dosay-Akbuluta et *al.*, (2005) ont montré une plus grande variation intra-spécifique entre les spécimens de *Fasciola* spp. d'hôtes différents de celui interspécifique.

La classification moléculaire s'est jusqu'à présent avérée être la méthode de choix, offrant une différenciation claire entre les deux *Fasciola* spp. et les formes intermédiaires (hybrides et introgression).

Malgré l'impact de la fasciolose en Algérie, une seule étude restreinte à une seule localité a évalué la diversité génétique des douves de *Fasciola* prélevées sur des moutons (Farjallah et *al.*, 2009).

Notre thèse s'est donc axée sur l'étude des distomatoses bovines dans trois wilayates avec la chronologie suivante :

i) Une synthèse des données bibliographiques sur *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum*

ii) Présentation de l'étude expérimentale (échantillonnage, régions d'études, techniques d'analyses)

iii) Détermination la prévalence de la fasciolose et de la dicrocœliose dans les abattoirs de Tizi-Ouzou, Bouira et Bejaia, sur la base de différentes techniques de diagnostiques utilisées à savoir : inspection des foies, analyses coprologiques, analyses de la bile, analyses sérologiques (test ELISA). Détermination des différents facteurs de risques de la parasitose (sexe, âge, race, saison)

iiii) Évaluation de la cinétique des anticorps à *Fasciola hepatica* chez les bovins naturellement infestés abattus au niveau des abattoirs au nord de l'Algérie grâce au taux d'anticorps révélé en ELISA, et les différents facteurs de risques de leurs variation (sexe, âge, race ,saison).

iiiii) Réalisation de coupes histologiques des différents spécimens récoltés de *Dicrocoelium* spp.

iiiii) Etude de la 1 variabilité génétique des échantillons de *Fasciola* spp. récupérés de différentes régions algériennes, basées sur plusieurs marqueurs moléculaires (ITS, COI-trnT-rrnL, NADI et COI).

iiiii) Connaitre la variabilité morphométrique des échantillons de *Fasciola* dans les différentes localités.

**CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

***A\*Fasciola hepatica***

## I. ETUDE DE *FASCIOLA HEPATICA*

### I.1. Historique

*Fasciola hepatica* (grande douve du foie) est très anciennement connue puisqu'il s'agit du premier trématode identifié, après la description de la maladie par des éleveurs dont l'importance économique et la santé publique sont importantes dans le monde entier. Il est connu depuis plus de 630 ans et de nombreux travaux de recherche ont été menés sur le cycle de vie de cet important parasite (Moazeni et Ahmadi, 2016). Les événements les plus importants dans l'histoire de *F. hepatica* sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau I).

**Tableau I :** Historique sur la découverte et la description du cycle de vie de *Fasciola hepatica* (Moazeni et Ahmadi, 2016)

Date	Scientifiques et événements	Références
1379	Jean de Brie trouve la douve du foie pour la première fois	Grove, (1990)
1523	1523 Anthony Fitzherbert décrit pour la première fois la douve du foie dans un livre publié.	Cole, (1944)
1698	Govard Bidloo décrit les vers comme les parasites des voies biliaires des moutons, des bovins et des humains	Reinhard, (1957)
1758	Linnaeus gave the definitive Latin name of Fasciola hepatica to the liver fluke	Reinhard, (1957)
1875	David F. Weinland, trouve les stades larvaires de <i>F. hepatica</i> dans le foie de <i>Limnaea truncatula</i>	Reinhard, (1957)
1881	Thomas a décrit la morphologie, l'habitat et la biologie de l'hôte intermédiaire de <i>F. hepatica</i> (actuellement connu sous le nom de <i>Galba truncatula</i> ).	Reinhard, (1957)
1882	Rudolf Leuckart ont affirmé que les jeunes douves migraient des intestins vers le foie, par le canal biliaire principal.	Reinhard, (1957)
1893	Adolpho Lutz réussit à infecter des cobayes, un lapin, une chèvre et un rat brun avec la douve du foie en ajoutant les kystes (métacercaires) à leur nourriture.	Reinhard, (1957)
1926	Sinitsin (1926) prouve que les jeunes douves, après avoir été libérées de leurs kystes dans l'intestin grêle, ne vont pas directement au foie, mais pénètrent dans la paroi de l'intestin, migrent à travers la cavité du corps et se creusent dans le foie à partir de la capsule.	Andrews, (1999)

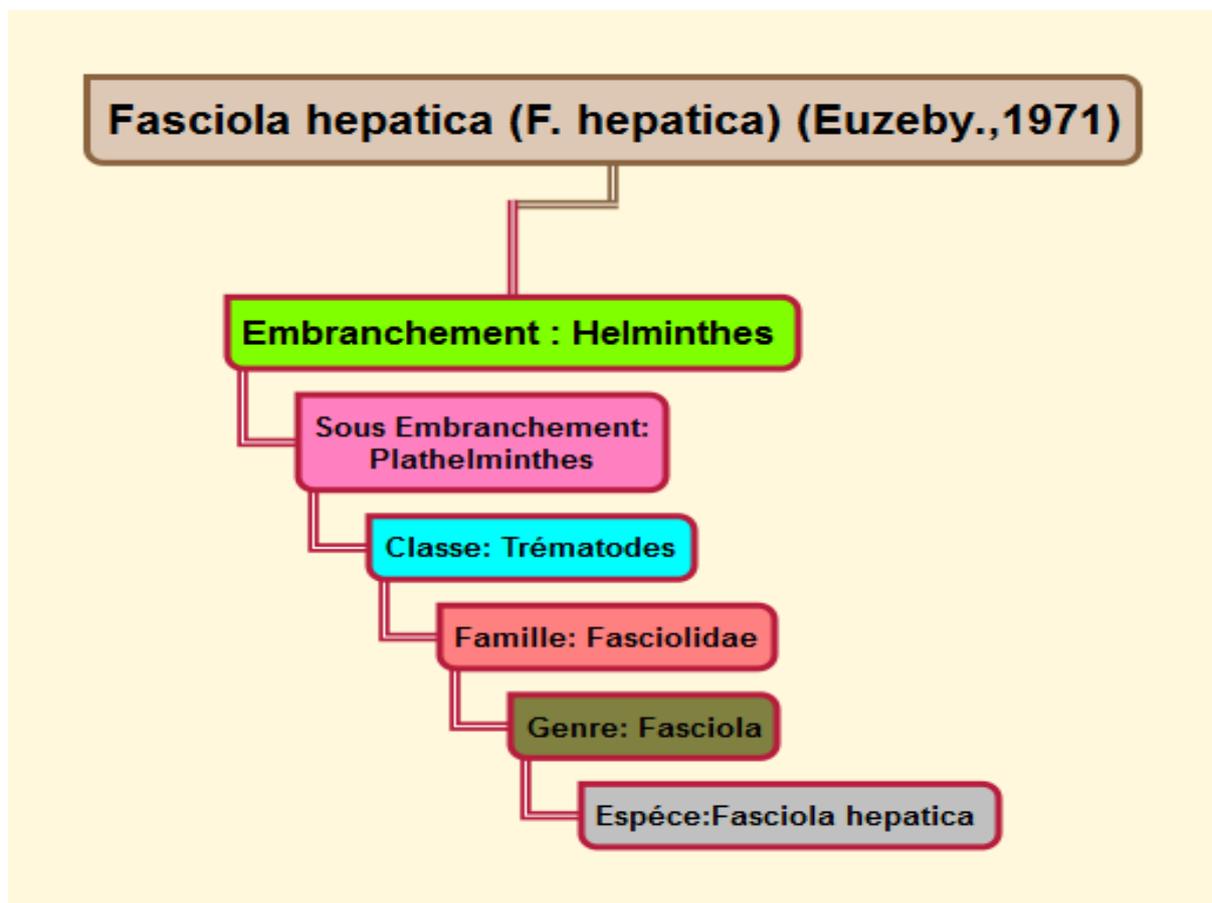
- Le concept actuel de *Fasciola hepatica* fut proposé par Linne en 1758, et est dérivé du grec et du latin : *Fasciola* «small band» et hepai «liver»; son cycle biologique fut décrit par Steemnstrip en 1842 puis repris par Leuckart (1882) et Thomas (1883) qui ont

découvert le développement larvaire de la douve chez *Lymnaea truncatula* et confirmèrent le rôle d'hôte intermédiaire de ce mollusque (Ripert et al., 1998).

- Barlow (1925) et Van Hantsma (1950) ont attribué l'ouverture de l'opercule de l'œuf à l'existence d'enzymes libérées par le miracidium sous l'effet stimulateur de la lumière. Rowan, en 1956, confirma cette hypothèse (Ripert et al., 1998).

- En Algérie, les études concernant la distomatose hépatobiliaire à *Fasciola hepatica* et son hôte intermédiaire, débutèrent dès les années 1800, mais restent néanmoins insuffisantes, comparées à celles menées en Europe (Ripert et al., 1998).

## I.2. Position systématique (Figure 1)



**Figure 1** : classification de *Fasciola hepatica* (Euzeby, 1971a)

### I.3. Morphologie des différents stades du parasite

#### I.3.1. L'œuf

Les œufs de *Fasciola hepatica* sont de forme ovoïdes, de coloration brun-jaunâtre mesurant 130 à 150  $\mu\text{m}$  de long et 60 à 90 $\mu\text{m}$  de large, avec la présence d'un opercule à l'une de leurs extrémités (Nozais et *al.*, 1996). Ces œufs, non embryonnés à la ponte, sont de contenu granuleux et homogène, renfermant deux syncytiums, l'un embryonnaire situé à proximité du pôle operculé et l'autre vitellin occupant le reste de l'œuf (Euzeby, 1998) (Figure 2).



**Figure 2 :** Œuf de *Fasciola hepatica* observé au microscope optique (1)

#### I.3.2- Le miracidium

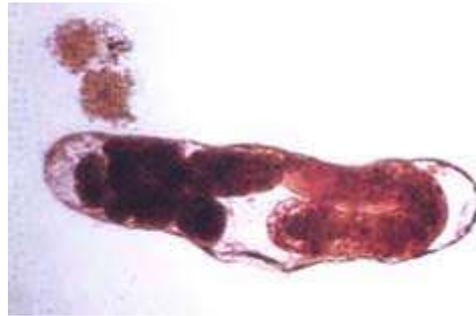
C'est une larve de première génération de forme triangulaire mesurant 130  $\mu\text{m}$  de long, large en avant avec une extrémité postérieure pointue. A sa partie antérieure se loge une papille apicale et des glandes céphaliques à sécrétion enzymatique. Sa partie postérieure renferme un amas de cellules reproductrices ou balles germinales (Nozais et *al.*, 1996) (Figure 3).



**Figure 3:** photo miracidium de *Fasciola hepatica* (Moreau et *al.*, 1997)

### I.3.3- Sporocyste

Le sporocyste est une larve de forme irrégulière plus ou moins ovalaire mesurant environ 300µm, délimitée par deux membranes. C'est un sac en soi, sa structure morphologique est limitée à la présence d'un système excréteur, formé de deux protonéphridies, et de cellules germinales (Nozais et *al.*, 1996)(Figure 4).



**Figure 04 :** sporocyste de *Fasciola hepatica* sous microscope optique (Carrada-Bravo, 2007).

### I.3.4- Rédie

La rédie est une forme larvaire allongée, mesurant 250 µm. Comportant un tube digestif composé d'une bouche, d'un pharynx musculueux et d'un intestin, un système excréteur protonéphridien et des cellules germinales (Nozais et *al.*, 1996)(Figure 5).

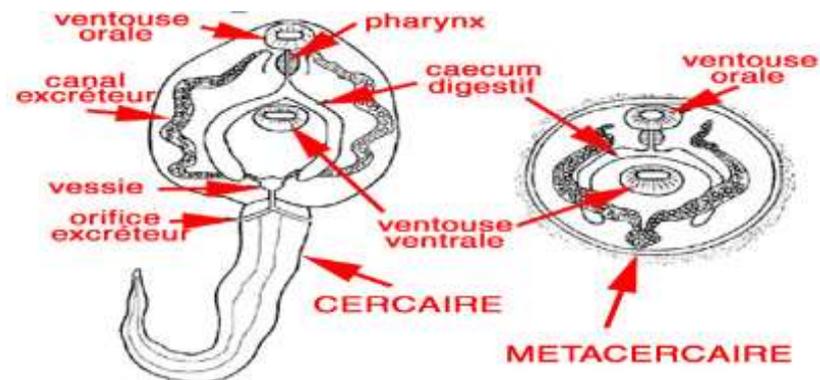


**Figure 05 :** Rédie de *Fasciola hepatica* sous microscope optique (Soulsby, 1982).

### I.3.5-Cercaire

Ce stade larvaire est composé de deux parties (figure 6) : le Corps cercarien: de forme ovalaire, mesurant 330 à 350 µm de diamètre (Euzéby, 1998), contenant des organes

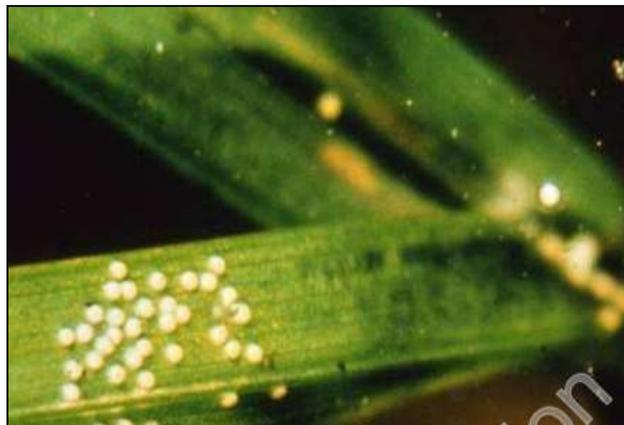
comparables à ceux du stade adulte. La cercaire est le stade larvaire sous lequel le parasite est expulsé de la limnée.



**Figure 6** : Schéma de la cercaire de *Fasciola hepatica*. (2)

### I.3.6- Métacercaire

Il s'agit de la forme infestante, elle est de couleur blanchâtre et de forme globuleuse avec un diamètre qui varie entre 300 et 350  $\mu\text{m}$  (Euzéby, 1998). Elle possède les mêmes organes que ceux du stade cercaire sauf pour les glandes kystogènes qui sont remplacées par des glandes de pénétration (Nozais et *al.*, 1996).(figure 7).

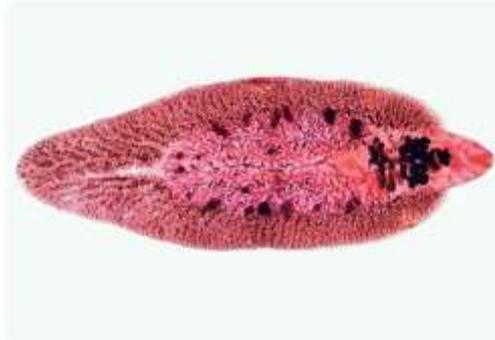


**Figure 07** : Morphologie du stade larvaire métacercaire sur un support végétale (Bobsari, 2005 cité par Bendiaf Houda., 2011).

### I.3.7- Forme adulte

*F. hepatica*, communément appelée grande douve du foie, est un vers plat en forme de petite feuille, mesurant 2 à 3 cm de long sur environ 1 cm dans sa plus grande largeur. Il possède à son extrémité antérieure deux ventouses l'une buccale et l'autre ventrale (figure 8) qui lui permettent de s'attacher à l'épithélium des voies biliaires (Acha et

Szyfres, 1989 ; Moulinier, 2002). Il est hermaphrodite possédant à la fois des organes génitaux mâles et femelles. Le parasite adulte colonise les voies biliaires de son hôte définitif où les œufs sont pondus et émis dans les selles.

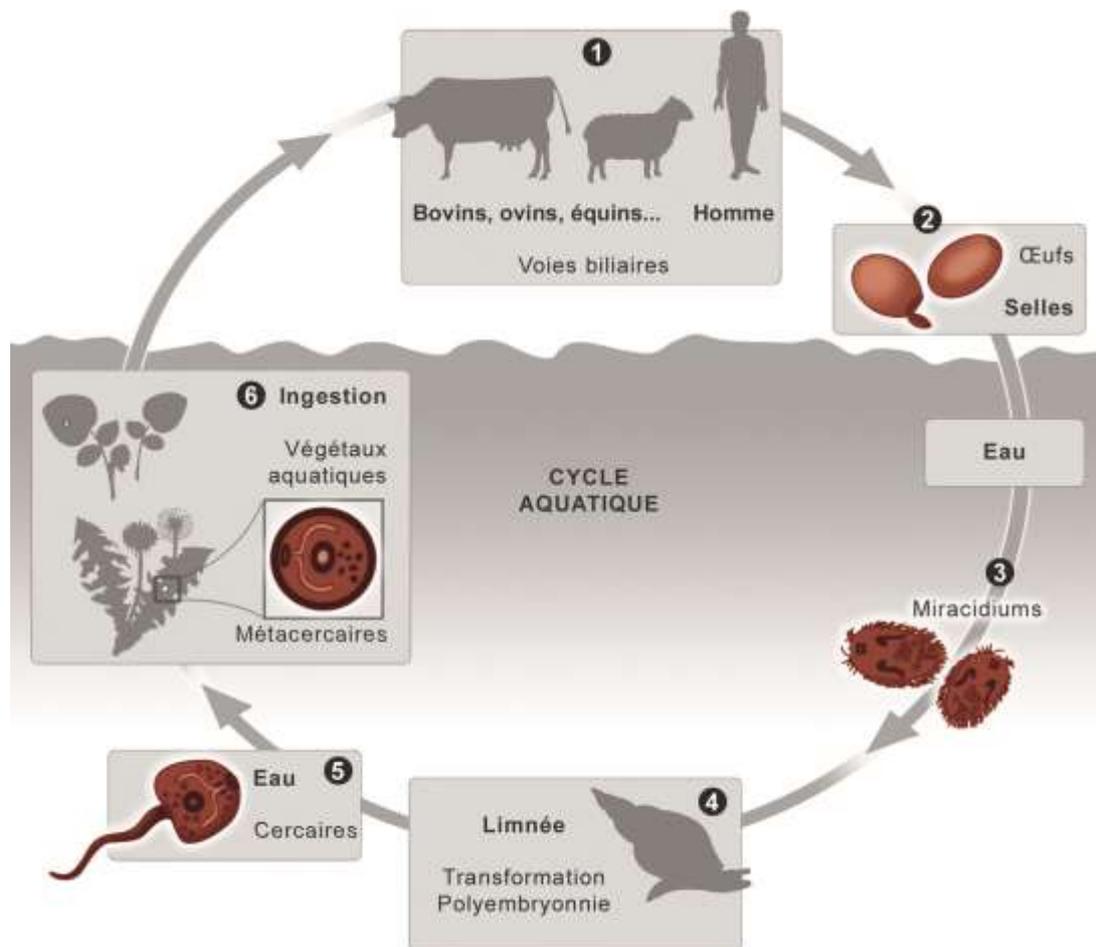


**Figure 8:** Aspect morphologique de *Fasciola hepatica* adulte (3)

#### **I.4. Cycle Evolutif de *Fasciola Hepatica***

Le déroulement du cycle évolutif de *F. hepatica* (Figure 9) exige ; un hôte intermédiaire (mollusque aquatique gastéropode), un hôte définitif (bovin ; ovin) qui sont source d'infestation du milieu extérieur et enfin la présence de facteurs climatiques favorables comme la température et l'humidité. Le cycle complet de développement est de l'ordre de 6 mois (3 mois de cycle exogène de l'œuf aux métacercaires et 3 mois de cycle endogène de l'ingestion des métacercaires à la présence de douves adultes dans les canaux biliaires).

Les douves adultes présentes, dans les canaux biliaires de l'hôte définitif (moutons, bovins) émettent des œufs dans les selles. Les œufs éclosent dans les pâturages un miracidium (1<sup>ère</sup> larve) est libéré et cherche activement et pénètre un mollusque (hôte intermédiaire). Une fois à l'intérieur de la limnée, ils subissent un certain nombre de stades de développement à savoir des sporocystes, rédies et des cercaires. Les cercaires quittent la limnée, nageant librement et s'enkystent sur la végétation en métacercaires (stades infectieux). Ces derniers sont ensuite ingérés par l'hôte définitif qui sont les mammifères. Les métacercaires nouvellement existées se désenkystent, et migrent vers le foie et les voies biliaires, les œufs sont pondus par la forme adulte du parasite et le cycle continue (McDougall, 2012).



**Figure 9** : Cycle de vie de la grande douve du foie, *Fasciola hepatica* (4)

#### I.4.1. L'infestation de l'hôte définitif

Les animaux s'infestent en ingérant les métacercaires enkystées aux extrémités des feuilles des végétaux. Le cycle évolutif peut alors se poursuivre, le parasite subit alors un désenkystement des métacercaires. À la suite de ce désenkystement ils pénètrent à travers la muqueuse intestinale dans la cavité péritonéale où ils broutent sur les tissus disponibles. Ils migrent ensuite vers le foie vers le 4<sup>ème</sup> -6<sup>ème</sup> jours post-infection. La douve immature migre à travers le tissu hépatique, se nourrissant de tissus disponibles et causant des hémorragies avant de finalement atteindre les voies biliaires autour de la 7<sup>ème</sup> semaine suivant l'infection où ils poursuivent leurs développement jusqu'à maturation sexuelle, et commence à produire des œufs et le cycle se répète (Acosta et *al.*, 2008 ; Andrews, 1999 ; Schmidt et Roberts, 2005)(figure 9).

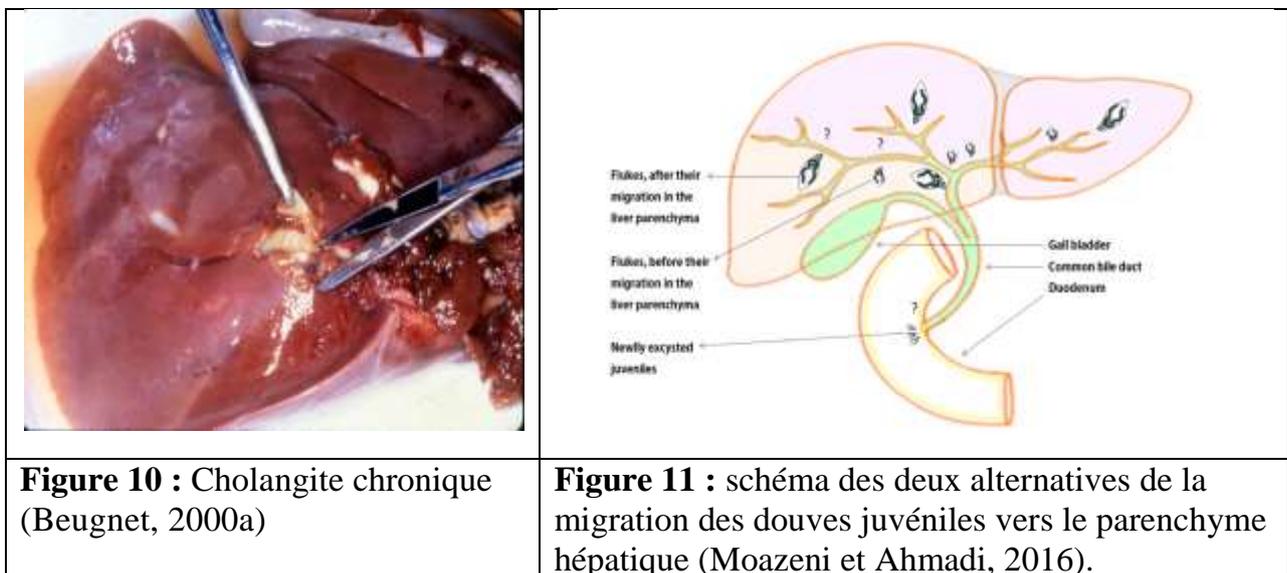
Moazeni et Ahmadi, (2016) ont réalisé un travail de recherche sur le cycle de vie du parasite suggérant que l'entrée du parasite dans les voies biliaires, après leur migration

dans le parenchyme hépatique semble douteuse. Cependant, compte tenu de tous les faits relatifs aux phases hépatiques et biliaires du cycle de vie de *F. hepatica*, deux alternatives concernant leurs migrations sont suggérées :

-1) une partie des douves juvéniles en migration peut entrer dans les voies biliaires immédiatement après avoir atteint le parenchyme hépatique alors qu'ils sont encore très petits.

Ou

- 2) lorsque des douves juvéniles pénètrent dans la paroi intestinale pour atteindre le foie par la cavité abdominale, un certain nombre de ces douves peuvent pénétrer dans le cholédoque et atteindre les voies biliaires hépatiques (Figure 11).



#### I.4.2. Infestation du milieu extérieur

Les œufs sont éliminés par la bile et se retrouvent dans les fèces avant d'être rejetés avec eux dans le milieu extérieur. Leur développement dépendra de plusieurs facteurs comme ; un délitage des matières fécales (pluie, piétinement des animaux), l'humidité et l'aération, une température comprise entre 10°C et 30°C et la lumière.

Après une incubation de **trois** semaines, le miracidium mobile de première génération libéré de l'œuf pénètre rapidement dans un mollusque spécifique, *Limnaea truncatula* favorisée par **un phototropisme positif** du miracidium, le poussant à aller vers les zones ensoleillées et à la surface de l'eau, lieu où vivent habituellement les limnées et **un chimiotropisme** exercé par les limnées elles-mêmes.

### **I.4.3. Infestation de l'hôte intermédiaire**

Le mollusque d'eau douce, la limnée (*Galba truncatula*) vit le long des cours d'eau et des rigoles de drainage des prés. L'infestation de la limnée a lieu principalement en début d'été. Avant d'atteindre le stade cercaire, le miracidium se transforme en sporocyste, puis le sporocyste en rédies. Les premières rédies apparaissent progressivement à partir du 14<sup>ème</sup> jour (à 20 °C) ; elles gagnent ensuite la glande digestive de la limnée. Chaque rédie forme 16 à 20 cercaires pourvues d'une queue mobile. Elles seront rejetées ainsi dans le milieu extérieur.

### **I.4.4. Evolution de la cercaire dans le milieu extérieur**

Les cercaires sont expulsées de la limnée vers le milieu extérieur aux environs de 20°C. Après s'être légèrement dispersées, elles se fixent grâce à leur ventouse ventrale sur un support comme des végétaux aquatiques, source de contamination des animaux. La queue de la cercaire se détache, le corps devient sphérique, une substance visqueuse l'entoure et forme, après solidification, un kyste protecteur (contre le froid, la chaleur, la sécheresse) très adhérent au support (élément infestant) (Meek et Morris, 1979).

## **II. EPIDEMIOLOGIE**

### **II.1. Répartition géographique de *Fasciola hepatica***

#### **II.1.1. Distribution de *Fasciola hepatica* dans le monde**

La fasciolose est une maladie ré-émergente dans plusieurs régions du monde, principalement en Afrique, causée par *F. hepatica* (zones tempérées) et *F. gigantica* (dans les zones tropicales) (Mas-Coma, 2004), et son incidence chez les animaux de ferme augmente après une période de fortes précipitations (Keyyu et al., 2005). En Afrique la fasciolose touche particulièrement les animaux pâturant près de la région du sud du lac Tchad (Jean-Richard, 2015). Dans la région côtière du Kenya, elle est causée par *F. hepatica* et a été considérée comme l'une des maladies parasitaires majeures chez les ruminants en causant une mortalité élevée chez les veaux et les petits ruminants (Mehmood et al., 2017). Les bassins fluviaux moyennement inondés durant la longue saison des pluies facilite la survie du parasite. En outre, les zones d'inondation ont un rôle important lors de l'infestation par *F. hepatica*. En Afrique 31 études ont rapporté la prévalence de la fasciolose dans 11 pays avec des prévalences plus élevées

chez les bovins allant de 1,2-91,0% et des prévalences plus faibles chez les ovins (0,19-73,7%), comme indiquées dans le (tableau II) (Mehmood et *al.*, 2017).

**Tableau II:** La fourchette des prévalences globales de la fasciolose chez les ruminants signalée dans les différents continents de 2000 à 2015 (Mehmood et *al.*, 2017)

Sr. No	Continent	Name of countries	No. of Countries	No. of studies	Range of prevalence in different ruminant species (%)			
					Sheep	Goats	Cattle	Buffalo
1	Africa	Chad, Egypt, Ethiopia, Kenya, Nigeria, Sudan, Tanzania, Tunisia, Uganda, Zambia, Zimbabwe	11	31	0.19–73.7	0.28–68.4	1.2–91.0	9.73–33.7
2	America	Argentina, Brazil, Colombia, Mexico, Peru	05	10	8.87–100	24.5–100	3.0–66.7	11.4–24.4
3	Asia	Bangladesh, Cambodia, China, India, Iran, Iraq, Japan, Korea, Nepal, Pakistan, Saudi Arabia, Turkey, Vietnam	13	41	0.35–31.4	0.0–47.0	0.71–69.2	2.08–68.0
4	Australia/Oceania region	Australia, Papua New Guinea	02	03	5.5–52.2	(18.2)	26.5–81.0	–
5	Europe	Belgium, Denmark, England, Germany, Ireland, Italy, Poland, Spain, Sweden, Switzerland, Wales	11	23	3–83.3	0.0–0.8	0.12–86.0	–

Les pays d'Amérique où la fasciolose des ruminants a été signalée sont : les États-Unis, le Mexique, Cuba, le Pérou, le Chili, l'Uruguay, l'Argentine, la Jamaïque et le Brésil (Usip et *al.*, 2014). En Amérique, la prévalence de la fasciolose a été rapportée dans cinq pays et 10 études ont mentionné la fourchette la plus élevée chez les caprins (24,5-100%) et la plus basse chez les bovins (3.0-66.7%)(Mehmood et *al.*, 2017)

La fasciolose est répandue dans de nombreuses régions d'Asie y compris les pays du Moyen-Orient (Iran, Irak, Arabie Saoudite, Russie, Thaïlande, Turquie, Chine, Vietnam, Népal, Japon, Corée, Philippines, Pakistan, Bangladesh et Cambodge)(Usip et *al.*, 2014).

### II.1.2 Distribution de *Fasciola Hepatica* en Algérie

La distribution de la fasciolose à *Fasciola hepatica* en Algérie est très difficile à établir étant donné le nombre insuffisant de travaux qui lui ont été consacrés, sachant que la seule banque de données disponible est représentée par les rapports provenant des abattoirs. Toutefois, ces statistiques ne peuvent être utilisées comme indicateurs de la prévalence de la fasciolose dans une zone donnée vu le manque de traçabilité des bovins au niveau des abattoirs.

## **II.2. Espèces affectées**

### **II.2.1. L'hôte définitif**

Les ruminants sont les hôtes les plus importants et parmi eux, les plus réceptifs sont les bovins et les ovins. Cependant plusieurs autres espèces peuvent être affectées à des degrés divers comme le porc, la chèvre, le cheval (Mas-Coma *et al.*, 1999a) et l'Emeu (Vaughan *et al.*, 1997). Les animaux sauvages tels que les rongeurs (souris, rats, écureuils, cobayes) et les ongulés (cervidés, buffles, bisons et chevreuils) (Pybus, 2001) peuvent aussi en être affectés. Les ruminants sauvages sont très réceptifs, et joueraient le rôle de réservoir pour les ruminants domestiques. Les camélidés sont plus résistants que les autres ruminants. Les caprins sont réceptifs mais leurs habitudes alimentaires (consomment plus de buissons), les exposent moins au risque d'infestation. Enfin l'homme bien que peu exposé par ses habitudes alimentaires est sensible et réceptif il intervient dans le cycle comme un hôte accidentel.

### **II.2.2. L'Hôte intermédiaire**

Pour bien comprendre l'épidémiologie de *Fasciola* spp. une meilleure connaissance des habitats des limnées, des espèces de limnées agissant comme hôtes intermédiaires et de la prévalence de l'infection par *F. hepatica* dans les limnées est requise (Cañete *et al.*, 2004)

## **II.3. Sources, résistance du parasite et les modalités d'infestation**

### **II.3.1. Sources du parasite**

Les sources indirectes de parasite sont représentées par les bovins adultes qui hébergent les douves adultes, éliminant ainsi les œufs dans les milieux extérieurs avec les matières fécales, les veaux constitueraient également une source assez importante lors des deux premières années. On note également les caprins, les ovins, les ruminants sauvages, et les léporidés comme autres sources du parasite. On retrouve en dernier lieu les limnées qui sont l'hôte intermédiaire qui, une fois infesté par le miracidium va libérer en fin de son évolution des cercaires dans le milieu extérieur. (Mas-Coma *et al.*, 2019).

## **II.3.2. Résistance du parasite**

### **a- Les Œufs**

Résistent 2 à 3 mois en milieu humide (fèces), mais rapidement détruits en milieu sec ; ainsi tous les œufs rejetés en fin de saison sèche sont généralement détruits des jours voir quelques heures après, sauf dans le cas de rejet d'œufs dans l'eau. (Zagare., 1992)

### **b- Les Formes larvaires chez la limnée (miracidium, sporocystes, rédies, cercaires)**

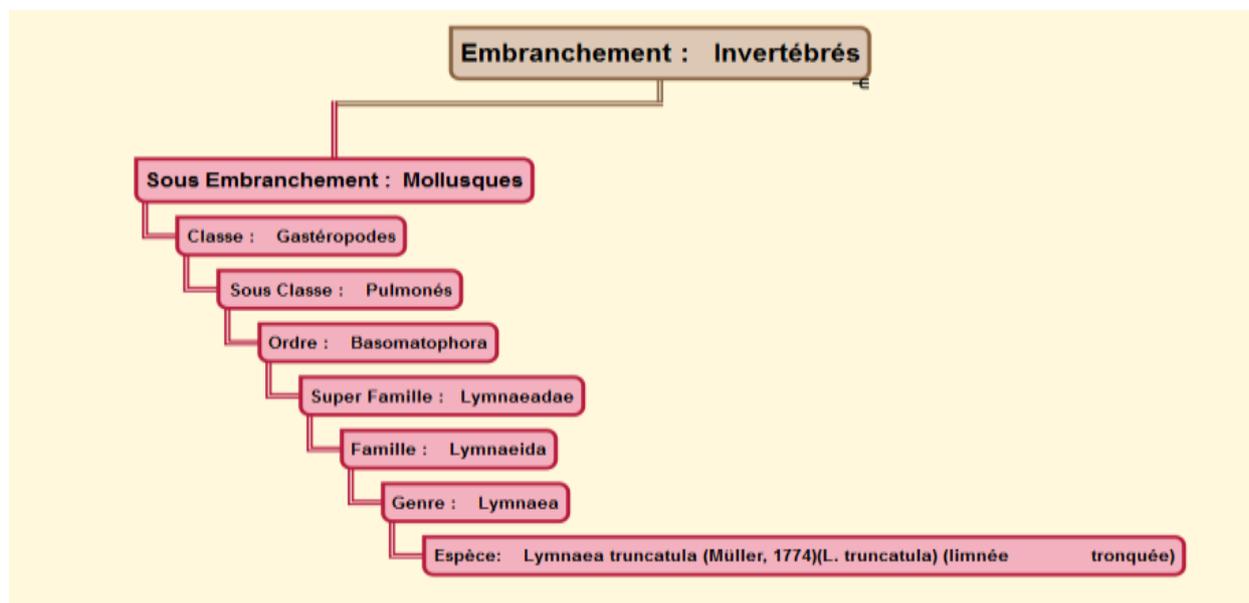
Cette résistance est directement liée à la survie des mollusques. Le miracidium issu de cette éclosion, devient actif et nage dans l'eau avec des trajets pratiquement linéaires montrant une tendance aux ondulations régulières avec une fréquence de 2 par seconde et nage activement à grande vitesse (1.3-1.4mm/sec) à l'aide des cils épidermiques qui recouvrent son corps (Wilson et Denison, 1970). Il doit rencontrer son mollusque- hôte dans les 48 heures qui suivent l'éclosion (Thomas, 1883 ; Cawdery et *al.*, 1977). Sa pénétration s'effectue à la fois par le manteau et le pied de la limnée ; cependant, ceux qui pénètrent par le pied sont progressivement dégénérés. À 25°C, des rédies ont été trouvées dans les tissus pré-œsophagiens au septième jour et dans les acini de la glande digestive le 9<sup>ème</sup> jour. Les Cercaires sont apparues le 38<sup>ème</sup> jour. A la température ambiante, le trajet des larves en migration était similaire, et les cercaires ont été répandues pour la première fois le 57<sup>ème</sup> jour. Le développement était complètement inhibé à 5°C mais a repris à des températures plus élevées. Le nombre de cercaires sortant des limnées variait de 476 à 544 et s'étalait sur une période de 3 à 6 jours (Roberts, 1950).

### **c- Métacercaires**

Elles peuvent survivre plus d'une année en présence d'humidité (Dunn, 1978 ; Soulsby, 1982 ; Andrews, 1999) et sont détruites si le climat est sec et chaud. Elles deviennent infestantes au bout de 24 h d'enkystement.

## II.4. Hôte intermédiaire (*Galba Truncatula*)

### II.4.1. Position systématique (Figure 12)



**Figure 12** : Classification de la *lymnaea truncatula* (hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica*) (Müller, 1774)

#### a-Taxons concernés

L'hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica* est un mollusque gastéropode pulmoné d'eau douce, appartenant aux Basomatophora qui sont caractérisés par la position des yeux au niveau de la base des tentacules. Ce groupe de mollusque arbore une grande importance en médecine humaine et vétérinaire du fait de son implication dans la transmission d'un grand nombre de parasites à l'homme et à l'animal ; ce sont des espèces aquatiques ou amphibies qui peuvent respirer l'oxygène atmosphérique grâce à leur cavité pulmonaire. La majorité appartenant à la famille des lymnaeadae dont la plus fréquente est *G. truncatula* ; cependant d'autres mollusques peuvent éventuellement assurer le développement. Au moins 20 espèces de Lymnaeadae sont impliquées dans la transmission de *F. hepatica* du foie mais la principale espèce signalée est *Lymnaea truncatula* (Dawes, 1968 ; Bargues et *al.*, 2001). (Tableau III).

**Tableau III : Différentes espèces de mollusques hôtes intermédiaires de la fasciolose.**

Espèces	Pays	Références
<i>Lymnaea truncatula</i> ou <i>Galba truncatula</i> (Müller, 1774)	Europe Quelques régions de l'Amérique du sud Afrique	(Boray, 1966 ; Graczyk et Fried, 1999) Jabbour-Zahab et al., 1997; Meunier et al., 2001)
<i>Lymnaea tomentosa</i> (Pfeiffer, 1855)	Nouvelle Zélande Australie	(Boray, 1966)
<i>Lymnaea columella</i> (Say, 1817)		(Nozais, 1996)
<i>Lymnaea occulta</i>	Europe	(Correa et al., 2010)
<i>Lymnaea stagnalis</i>		(Remigio, 2002 ;
<i>Lymnaea palustris</i>		Bargues et al., 2003 ;
<i>Lymnaea palustris turricola</i>		Bargues et al., 2001)
<i>Lymnaea fuscus</i>		
<i>Lymnaea corvus</i>		
<i>Radix ovata</i> (Draparnaud, 1805)		(Dreyfuss et al., 2002) (Rondelaud et al., 2001)
<i>Lymnaea glabra</i> (= <i>Stagnicola glaber</i> ) (Müller, 1774)		Dreyfuss et al., 2003)
<i>Anisus leucostoma</i> (Millet, 1813) (= <i>Planorbis leucostoma</i> )		(Abrous et al., 2000)
<i>Fassaria obrussa</i>	Amérique du Nord	(Correa et al., 2010)
<i>Fassaria bulimoides</i>		(Correa et al., 2010)
<i>Lymnaea humilis</i>		(Correa et al., 2010)
<i>Stagnicola caperata</i>		(Correa et al., 2010)
<i>Lymnaea diaphana</i>	Amérique du Sud	(Nozais, 1996)
<i>Lymnaea cousini</i> (Jousseume, 1887)		(Correa et al., 2010)
<i>Lymnaea cubensis</i> (Pfeiffer, 1839)	Amérique du Sud Amérique Centrale	(Bargues et al., 1997; Samadi et al., 2000)

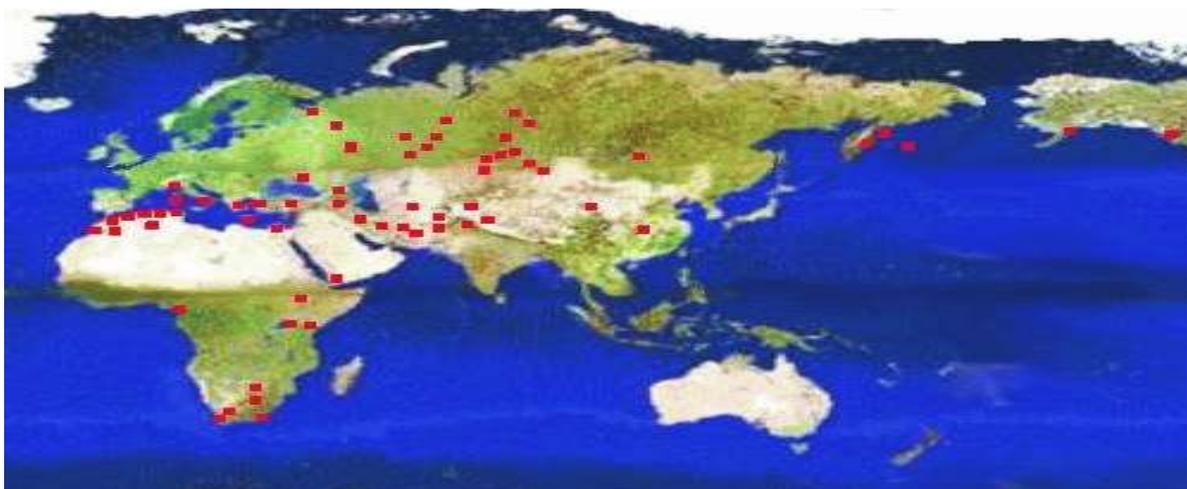
#### 11.4.2. La distribution mondiale de la limnée *Galba Truncatula*

La *Galba truncatula* est plus connue pour son rôle d'hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica*. Cette limnée se caractérise par une large distribution géographique comprenant l'Afrique, l'Asie, l'Europe et l'Amérique du Nord (Seddon et al., 2015). En Amérique du Sud, cette limnée est également présente dans plusieurs pays et aurait été introduite d'Europe (Bargues et al., 2017).

Selon Hubendick (1951), la limnée tronquée est présente en Europe comme la grande Bretagne, l'Islande, les pays bas et dans la plupart des pays de la méditerranée. Elle est

signalée en Afrique du nord (Maroc, Algérie et Egypte) ainsi qu'en Afrique du sud (Kenya, Cameroun et Ethiopie). Elle est également présente en Asie (Syrie, Iraq, Iran, Afghanistan et le nord-est du Pakistan à une altitude de 1200 m) (Kendall, 1954). Hubendick (1951) la signala en Amérique du nord principalement au Canada.

La répartition de cette limnée est présentée sur la figure 14. Elle est fréquente dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord, notamment dans l'Europe de l'Ouest ; mais on la rencontre sur d'autres continents. Le développement des populations de *G. truncatula*, et la transmission de *F. hepatica* sont dépendants du climat du pays où vit le lymnaeid. Les conditions les plus favorables sont des températures comprises entre 10°C et 25°C et une humidité relative élevée en fonction des précipitations atmosphériques (Taylor et Taylor, 1965)



**Figure 13:** Répartition géographique de *L. truncatula* (en carré rouge) (5)

### II.4.3. Présentation du mollusque

*Galba truncatula* O.F. Müller, 1774, est un petit mollusque amphibie avec une hauteur de 12 mm à l'état adulte, on le rencontre fréquemment dans les prairies marécageuses, les fossés qui les bordent et sur les berges des cours d'eau (Rondelaud et *al.*, 2017). Il présente une coquille hélicoïdale à enroulement dextre, dépourvue d'un opercule qui vit surtout aux extrémités distales des rigoles de drainage superficiel ou d'écoulement naturel de l'eau (Marie Rieu, 2004) et caractérisée selon l'âge par 5 à 6 tours de spires séparées par une suture profonde (Sevo, 1971). Le dernier tour de spire présente une ouverture ovalaire égale à la demi-hauteur totale de la coquille (Euzéby, 1998). La

couleur de cette dernière dépend du milieu écologique où se trouve la limnée, elle est en général brunâtre ou grisâtre finement striée comme le montre la Figure 14.



**Figure 14:** *Lymnaea truncatula* (6)

#### **II.4.4. Habitat du mollusque**

*Lymnaea truncatula* est une espèce amphibie d'eau douce qui colonise l'extrémité distale des rigoles où se trouvent les sols humides argileux légèrement calcaires (Wright et Swire, 1984). On en distingue deux types d'habitats : le premier étant permanent, constitue tous les terrains humides tels que les fossés d'irrigation, les rigoles de drainage, zones marécageuses et les berges des rivières dans lesquels la limnée pourra y vivre toute l'année grâce à ces conditions favorables à sa survie. D'autres gîtes existent dans la nature ce qui constitue le deuxième habitat qui contrairement au premier est temporaire pouvant être alternativement selon la saison rempli d'eau ou desséché ; cet habitat se caractérise par une population de *G. truncatula* variable et est représenté par les empreintes laissées par les animaux sur les sols humides, les fossés, les ornières tracées par les tracteurs, les sources, les petites marres temporaires et les petites flaques d'eau à flanc de colline (Leimbacher et *al.*, 1972), les bords des abreuvoirs, les bordures des oueds. Par contre ces limnées sont absentes dans les zones inondées temporairement par l'eau de mer à marée haute, dans les eaux pauvres en O<sub>2</sub> et l'eau courante (Marie Rieu, 2004). La durée de vie des limnées est de 6 à 12 mois ; elles survivent à des températures comprises entre 0°C et 28° C ; elles sont actives entre 10°C et 20°C (Donnadieu, 2001). Bien que *G truncatula* se trouve généralement dans des habitats semi-aquatiques (Boray, 1969), y compris les sillons de drainage, cours d'eau lents, les zones humides temporaires et berges des rivières et des étangs, l'abondance de *G. truncatula* était associée de manière significative aux précipitations mensuelles, mais pas à la température mensuelle

(Charlier et *al.*, 2014, Rondelaud et *al.*, 2011 ; Schweizer et *al.*, 2007), ils résistent à la sécheresse et au gel; il s'enterre ou hiberne en s'enfouissant dans la boue pendant de longues périodes ( Armour, 1975; Schweizer et *al.*, 2007). Les habitats des limnées ne sont facilement identifiables qu'à certains moments de l'année, par exemple au printemps/été et à l'automne, lorsque l'abondance des limnées adultes et juvéniles atteint son maximum (Charlier et *al.*, 2014 ; Gonzalez et *al.*, 1991, Relf et *al.*, 2011). Les algues cyanophycées et chlorophycées constituent la source alimentaire préférable de *L.truncatula* (Nozais et *al.*, 1996). C'est un mollusque qui ne supporte ni les grandes températures d'été ni les très basses températures d'hiver. La température doit être égale ou supérieure à 10°C. Il estive et hiberne quand les conditions sont défavorables et reprend son activité au début de l'automne et du printemps (Nozais et *al.*, 1996).

#### **II.4.5. Infestation des bovins**

L'infestation est contractée par ingestion des métacercaires présentes sur les végétations consommées par les ruminants tels que le cresson, la mâche et le pissenlit; d'après la succession des générations de limnées, on parle habituellement de 3 périodes à risque de contamination des bovins par *Fasciola hepatica* ; infestation au printemps, infestation au début d'été et Infestation de fin d'été-automne (Donnadieu, 2001).

**II.4.5.1. Infestation au printemps** : par les premières métacercaires infestantes provenant soit de la population de métacercaires ayant survécu à l'hiver, soit de cercaires issues de limnées parasitées transhivernantes qui rejettent les limnées à la sortie de leur hibernation sauf pour les pays très froids où malgré la survie des métacercaires durant l'hiver elles perdent leurs pouvoir infectant. Les bovins, après une saison passée à l'étable ou au pré avec comme fourrage principal le foin ont un goût particulier pour l'herbe à cette saison. La quantité d'herbe produite par la forte poussée de la végétation à cette période de l'année limite le pâturage des zones à risques par les animaux et limite la probabilité de rencontre des métacercaires et des bovins et donc la contamination de ces derniers. Ceci est renforcé par le faible nombre d'éléments infestants présents. Correspondant à la période de reprise d'activité pour les limnées (Donnadieu, 2001). Cependant l'infestation de printemps ne représente pas un risque important d'infestation. (Euzéby, 1998)

**II.4.5.2. l'Infestation de début d'Eté** durant cette période, la pousse de la végétation est ralentie. L'herbe se fait plus rare. Les animaux vont avoir tendance à se rapprocher des zones qu'ils pouvaient avoir jusque là délaissées et donc aller plus vers les zones humides et se rapprocher en même temps des zones d'habitat des limnées ce qui conduit à une possible consommation de métacercaires. La pratique du surpâturage favorise ce risque (Donnadieu, 2001). Selon Mage (1989), ce n'est cependant pas la période durant laquelle s'effectue la plus forte contamination

**II.4.5.3. Infestation de fin d'Eté–Automne ;** cette période concerne les animaux jusqu'à la rentrée à l'étable; sur cette période, l'herbe n'atteint pas son abondance du printemps et l'humidité redevient suffisamment favorable pour que les limnées infestées s'éloignent de leurs zones de vie permanente et libèrent à cette occasion des cercaires. Les bovins vont se rapprocher des zones humides qu'ils avaient jusque là plus ou moins délaissées, où l'herbe est plus abondante. Par ailleurs, le nombre de limnées s'est accru tout au long de la belle saison; on constate alors une augmentation accrue du nombre de limnées parasitées (Donnadieu, 2001). On se trouve donc avec une charge élevée en éléments infestants sur les végétaux (Donnadieu, 2001). Tous ces facteurs contribuent à faire de cette période, la période majeure de contamination comme a pu le montrer Mage en 1989 dans son étude menée sur l'infestation naturelle des veaux sous la mère ; alors que moins d'un animal sur deux (44 %) est infesté après la belle saison. Tous les animaux (100 %) le sont à la rentrée en étable en novembre. Cette période de fin d'été – automne constitue donc une période privilégiée pour l'infestation des bovins (Donnadieu, 2001). Toutes ces données sont à moduler en fonction de l'année considérée. Par exemple, un été sec pourra favoriser une contamination plus précoce des animaux.

## **II.5. Facteurs favorisants**

Ce sont dans la plupart du temps des facteurs qui permettent et qui favorisent le déroulement du cycle de *Fasciola hepatica* et donc le rapprochement entre l'hôte intermédiaire et l'animal réceptif voir les bovins dans notre cas, ces facteurs sont essentiellement représentés par le facteur eau pour l'hôte intermédiaire et la conduite de l'élevage pour l'hôte définitif. L'analyse de la distribution de la maladie a montré que la

fasciolose est la maladie parasitaire à transmission vectorielle présentant la distribution la plus large connue (Mas-Coma et al., 2019)

### **II.5.1. Facteur eau et la nature du sol**

L'eau est l'un des facteurs essentiels au bon déroulement du cycle du fait que les limnées sont tributaires de ce dernier, la nature du sol intervient sur les deux plans humidité et teneur en calcium nécessaire à la formation de la coquille de la limnée ainsi ses besoins consistent en une eau propre riche en fer et en calcium, Nourriture sous la forme d'algues vertes, Température adéquate 20°C à 25°C est optimale et une Humidité suffisante mais peut résister à la sécheresse (fermeture de l'opercule). (Zagare.,1992)

### **II.5.2. Conditions climatiques**

L'impacte du climat sur la prévalence de la fasciolose chez les ruminants n'est pas nouveau du fait d'une étroite corrélation entre elles. Ceci a été démontré par les travaux de Mekroud et al., (2004) où la prévalence de la fasciolose à Jijel était nettement plus élevée chez les bovins 27% au lieu de 9,1% à Constantine, sachant que le climat de Jijel est bien plus humide où la pluviométrie annuelle est de 750-900 mm au lieu de 350 mm à Constantine. (Mekroud et al., 2004)

### **II.5.3. Mode d'élevage**

Très important à considérer, car le mode d'élevage intervient considérablement dans les capacités d'infestation. Considéré comme une maladie des pâturages, les animaux en stabulation permanente (mode d'élevage intensif) sont très peu exposés, contrairement aux animaux qui pâturent (mode d'élevage extensif) où ces derniers peuvent facilement contracter la maladie. (Zagare., 1992)

## **III. PREVALENCE DE LA FASCIULOSE**

### **III.1. Prévalence de la fasciolose dans le monde**

*Fasciola hepatica* est présente dans plus de 50 pays, sur tous les continents sauf l'Antarctique. Elle se trouve dans certaines parties de l'Amérique latine, les Caraïbes, l'Europe, le Moyen-Orient, l'Afrique, l'Asie et l'Océanie. *Fasciola gigantica* est moins

répandue. Des cas humains ont été signalés dans les régions tropicales, dans certaines parties de l'Afrique et de l'Asie, et aussi à Hawaï (Mage et *al.*, 2002).

### **III.1.1. Prévalence de la fasciolose animale**

D'après toutes les études effectuées, on estime que le continent asiatique est le plus infesté par rapport aux autres continents notant l'Inde, l'Indonésie et la Thaïlande comme étant les plus touchés ; On note les prévalences des infestations naturelles par *Fasciola hepatica* dans les élevages des ruminants domestiques dans le monde comme suit.

En Afrique quelques études ont été faites, en Tunisie la prévalence chez les ovins était estimée à 37.1% (Hamed et *al.*, 2014), chez les bovins dans le nord de la Tunisie était de 12.6% (Hamed et *al.*, 2014), et 25.4% chez les caprins (Hamed et *al.*, 2014), en Egypte chez les bovins 12.3% , chez les ovins 17.8% ,chez les chèvres 5.4% (El-Shazly et *al.*, 2002) .

La prévalence globale de l'agent pathogène était respectivement de 24,2%, 16% et 6,6% chez les vaches, les ovins et les caprins. Les données mensuelles montrent la prévalence la plus élevée enregistrée en juin (40,7%), alors que le minimum était en janvier au Pakistan (IrfanUllah et *al.*, 2016)

En Asie, l'infestation est nettement plus importante par rapport au autres continents ,en Iran chez les bovins 27 à 91% (Sahba et *al.*, 1972) et 20.1% au nord de l'Iran (Radfar MH et *al.*,2015) en Turquie chez les ovins 32.4% à Samsun, 25.4% à Sinop et 34.9% à Tokat (Acici et *al.*, 2017) en Inde chez les bovins 53.02% (Roy and Tandon, 1992), chez les porcs 12.92% (Roy et Tandon, 1992); en Thaïlande chez les bovins 85% (Srihakim et Pholpark, 1991); en Indonésie chez les bovins 25-90% (Soesetya, 1975).

En Amérique, de nombreuses études ont également étaient faites, à Haïti chez les bovins la prévalence était estimée à 10.7%-22.78%, chez les ovins 3.2%, chez les caprins 0.9% (Blaise et Raccurt, 2007); au Montana chez les bovins 17.24% (Knapp et *al.*, 1992) ;au Etats Unis on note en Floride chez les bovins 68% (Torgerson et Claxton, 1999), en Californie 52.7%, en Colorado 5.9%, en Idaho 36.7%, au Nebraska 19% ,au Texas 15.6-17.3% (Torgerson et Claxton, 1999) ; au Brésil à Itajubà chez les bovins 10.59% (Faria et *al.*, 2005); en Océanie en nouvelle Zélande chez les bovins 8.5%, chez

les ovins 4.4% (Torgerson et Claxton, 1999) ; en Australie en Queensland chez les bovins laitiers 8.4%, chez les bœufs 1.4% (Molloy et Anderson, 2006).

En Europe quelques études ont été également réalisées afin d'estimer la prévalence de la fasciolose chez les bovins et ovins ; en Belgique elle était de 12.5% chez les bovins (Torgerson et Claxton, 1999), contre 29.5% en Espagne chez les bovins et 14.7 chez les ovins (Gonzalez-Lanza et al., 1989) , en France cette prévalence chez les bovins était de 41.8 % en Limousin(MAGE C et al., 1989), de 82% en Cerdagne (Mage C et al., 1989) et enfin de 12.6% au centre de France (Mage et al., 2002).

Pour ce qui est des prévalences des infestations naturelles par *Fasciola hepatica* chez les bovins et ovins au niveau de quelques abattoirs dans le monde on note :

En Afrique, cette prévalence était au nord-ouest de l’Ethiopie 23.96% chez les bovins (Yeneneh A et al., 2012); en Egypte 2.0% chez les ovins et caprins et 3.5% chez les bovins (Torgerson P. et al., 1999).

En Amérique, cette prévalence chez les bovins était de 5.2 % au Mexique ; de plus de 94% au Chili et de 22.2% en Jamaïque (Torgerson P. et al., 1999).

En Asie cette prévalence était en Turquie de 29.3% chez les bovins et ovins (Celeb et Ultav, 1988).

En Europe la prévalence en France chez les bovins était de 11.2-25.2% (Mage et al., 2002).

### **III.1.2. Prévalence de la fasciolose humaine**

La répartition de la maladie humaine est en fonction d'une part de la densité des troupeaux d'herbivores et d'autres part de l'humidité des prairies permettant le développement de la limnée, hôte intermédiaire, entre 1970 et 1982, le nombre de cas dépistés sérologiquement en France dans les hôpitaux universitaires a été en moyenne de 450 par an. En 2010, l'O.M.S. conduit une évaluation de la situation mondiale et décrète plus de 500 000 personnes qui sont infectées chaque année, un chiffre très élevé qui dépasse toutes nos estimations. Cette pathologie concerne environ 2 millions et demi d'individus à travers le monde. En Afrique, de nombreux cas humains ont été détectés dans de nombreux gouvernorats d'Egypte, principalement les enfants (Curtale et

al. 2000, 2003a , b ; Haseeb et al. 2002 , Esteban et al. 2003 ). Les estimations initiales de 830 000 sujets affectés dans la région du delta du Nil (OMS, 1995 ) sous-estiment probablement la situation réelle si l'on prend compte les fortes prévalences atteignant 18 à 19% de la population totale dans des villages concrets (Esteban et al. 2003 ). Plus récemment, des zones d'endémie humaine ont été signalées en Ethiopie (Fentie et al. 2013 ) et en Tanzanie (Lukambagire et al. 2015), et des infections humaines sporadiques ont été signalées dans les pays du Maghreb, dans les pays d'Afrique subsaharienne et même jusqu'en Afrique du Sud, où l'infection s'est parfois avérée fatale (Black et al. 2013 ).

## **III.2. Prévalence de la fasciolose en Algérie**

### **III.2.1. Prévalence de la fasciolose animale en Algérie**

Peu d'études épidémiologiques ont été réalisées sur la fasciolose en Algérie, parmi elles on note les travaux de Mekroud et *al.*, (2004) dans l'Est algérien sur la prévalence de la fasciolose chez le bovin et l'ovin. Une étude préliminaire sur la prévalence de la fasciolose due à *Fasciola hepatica* dans quelques élevages bovins du Nord Centre Algérien (la Mitidja) où la prévalence était de 18.5% a été réalisée par Aissi et *al.* (2009).

En Algérie Titi et Mekroud en 2005 (travaux non publiés) ont découvert un cas de *Fasciola gigantica*, parasite totalement méconnu en Algérie chez un mouton à l'abattoir de Constantine. La prévalence des infestations naturelles par *Fasciola hepatica* dans les élevages de ruminants dans le Nord Est de l'Algérie était de 6.3 % chez les bovins et de 6.4% chez les ovins à Constantine et de 27.3% chez les bovins et 23.5% chez les ovins à Jijel (Mekroud A. et *al.*, 2004).

Pour se qui est de la prévalence des infestations naturelles par *Fasciola hepatica* chez les bovins et les ovins au niveau des divers abattoirs du Nord Est de l'Algérie, elle est de 9.1% chez les bovins et de 8.5%chez les ovins à Constantine et de 27% chez les bovins et 18.2% chez les ovins à Jijel (Mekroud A. et *al.*, 2004).

### III.2.2. Prévalence de la fasciolose humaine en Algérie

L'infection humaine survient en fonction des habitudes alimentaires (Consommation de végétaux sauvages). Elle est à l'origine de petites épidémies familiales ou collectives ainsi une enquête systématique est à mener dans l'entourage des patients), Contamination par l'ingestion de végétaux porteurs des métacercaires de *Fasciola hepatica*. Ainsi nous considérons l'ingestion de cresson sauvage contaminé comme étant le mode de transmission le plus fréquent.(Mas-Coma et al., 2019)

Ci-dessous les différents modes de contamination possible :

- Ingestion de plantes sauvages d'eau douce: les principaux aspects à prendre en compte sont les marqueurs végétaux des foyers de transmission, le cresson, d'autres plantes sauvages d'eau douce et les plantes sauvages vendues sur les marchés urbains.
- Ingestion de plantes d'eau douce cultivées, principalement de cresson.
- Ingestion de plantes cultivées terrestres nécessitant une irrigation fréquente.
- Ingestion de plantes sauvages terrestres: récoltées dans des habitats secs mais ayant été submergées dans l'eau quelques semaines ou quelques mois auparavant.
- Ingestion de plats locaux traditionnels à base de plantes sylvatiques contaminées.
- L'ingestion de foie brut infecté par des métacercaires en migration peut garder la capacité de reprendre la migration.
- Boire de l'eau contaminée.
- Boire des boissons et des jus à base de plantes locales.
- Ingestion de plats et de soupes à base d'eau contaminée.

Lavage de légumes, fruits, tubercules, ustensiles de cuisine ou autres objets avec de l'eau contaminée. (Mas-Coma et al., 2019)

La transmission du parasite de l'animal à l'homme par la consommation humaine de foies d'animaux infectés et d'humain à humain reste impossible ; toutefois très peu d'études ont été menées sur la fasciolose humaine en Algérie (Hazoug-Boemm et al., 1979; Hamrioui et al., 1980; Belkaid et al., 1989; Zait et al., 2005). Cependant, la fasciolose chez l'homme demeure une maladie négligée. Selon l'O.M.S., six cas ont été enregistrés depuis 1970 et 1990 (Nozais J.P., 1996) ; et quatre nouveaux cas humains ont été enregistrés dans le service de parasitologie du C.H.U.de Mustapha pacha entre 1990 et 2003 (Zait et al., 2005).

#### **IV. Impact économique de la fasciolose**

*Fasciola* infecte généralement les ruminants domestiques et provoque des pertes économiques importantes pour les moutons, les chèvres et les bovins. Dans les troupeaux commerciaux, la fasciolose est d'une grande importance économique dans le monde avec des pertes estimées à 3 milliards de dollars annuels, affectant plus de 600 millions d'animaux (Irfan-ur-Rauf et al., 2014). Cette perte économique est due à la mortalité du bétail, en particulier chez les ovins qui restent très sensibles, et par une diminution de la productivité par la réduction des rendements laitiers et de la viande chez les bovins (Irfan-ur-Rauf et al., 2014)

La fasciolose reste l'un des plus grands problèmes mondiaux et le plus important en raison de la mortalité des animaux, le coût du diagnostic, et le traitement du foie condamné et son implication dans la réduction de la production du lait et de la viande, dans les troubles de la fécondité, et la résistance aux médicaments contre la fasciolose (Keiser et Utzinger, 2007).

Au cours de la dernière décennie, de bons progrès ont été réalisés dans l'évaluation des impacts économiques de *F. hepatica* sur la production chez les ruminants, qui ont été largement examinés chez les ovins (Rojo-Vázquez et al., 2012) et chez les bovins (Charlier et al., 2014). Seulement un paramètre reste à ce jour difficile à établir qui consiste en l'impact de *F. hepatica* sur les paramètres de fertilité en utilisant des études aléatoires sur le terrain d'intervention. Cependant, le défi majeur est de développer des outils capables de quantifier l'impact économique de *F. hepatica* au niveau national, régional et à la ferme pour soutenir la prise de décisions par les gouvernements, les organisations de santé animale et les agriculteurs, respectivement, et qui peuvent être utilisés comme des outils de gestion efficaces. On cite un exemple «ParaCalc®» où l'impact économique annuel sur une ferme est estimé sur la base des résultats de tests de diagnostic spécifiques à la ferme et des impacts de production observés de *F. hepatica* (Charlier et al., 2012). Cependant, ce système utilise les estimations de la production moyenne comme intrants et, par conséquent, ne tient pas compte de la spécificité de l'exploitation, et il ne reflète pas l'effet sur la performance économique de l'ensemble de l'exploitation. Il s'agit d'une lacune importante car l'agriculteur doit être capable de comparer l'impact du contrôle de la douve du foie sur d'autres problèmes de

santé animale ou sur des interventions générales et des opportunités d'investissement (Beesley et *al.*, 2018).

#### **IV.1. Importance médicale**

##### **\*Sur le plan individuel**

La fasciolose est peu meurtrière chez les bovins. Mais ce constat ne doit pas faire oublier que les lésions hépatiques sont irréversibles. De plus lorsque la maladie s'associe à d'autres facteurs fragilisant tels que la sous alimentation, le polyparasitisme, elle évolue vers la phase de cachexie aqueuse et l'animal devient irrécupérable.

##### **\* Au sein d'un troupeau**

Cette trématodose sévit le plus souvent de façon enzootique. Les bovins apparemment sains entretiennent la maladie et constituent dans les zones à risques un danger pour les ovins dont la mortalité lors de la phase aiguë dépasse fréquemment 30% (Traore A., 1989). Les taux d'infestation peuvent atteindre 65% au niveau d'une région ou même 95% dans les localités les plus exposées (Birgi et Graber, 1969). Cette fréquence impose des traitements systématiques et périodiques ce qui entraîne des dépenses supplémentaires.

#### **IV.2. Impact zootechnique**

Les infections à *Fasciola hepatica* affecteraient plusieurs paramètres zootechniques tels que la prise de poids, la production de lait, teneur en solides du lait et fertilité du bétail (Black et Froyd, 1972 ; Lopez-Diaz et *al.*, 1998; Torgerson et Claxton, 1999). Les effets de la douve se comprennent en envisageant les dommages engendrés sur le foie et les fonctions occupées dans l'organisme par celui-ci. En effet, d'après Doy et Hughes (1984), on constate que c'est la dégradation du tissu hépatique pendant les 8 à 10 semaines de migration et la présence des douves dans les canaux biliaires qui posent problèmes et engendrent des baisses de production. D'après Mage (2002), les séquelles de la fasciolose sont beaucoup plus zootechniques que pathologiques malgré l'absence de mortalité et cela à cause de sa sévérité en raison de ses conséquences sur les productions animales.

#### IV.2.1. Fertilité et production du lait

Des études menées auparavant (1971, 1986, 1989) ont démontré que les douves du foie peuvent entraîner une diminution de la fertilité de l'hôte en modifiant le métabolisme et l'équilibre des hormones sexuelles normales, cependant l'effet de *F. hepatica* sur les performances de reproduction reste très peu exploité. Une étude menée par Lopez-Diaz et *al.*, (1998) utilisant une dose d'infection expérimentale élevée de 600 métacercaires, ont constaté que le premier œstrus a été retardé de 39 jours chez les génisses infectées par rapport à des contrôles non infectés. Cet effet était lié à l'œstradiol et à la progestérone plus faibles dans le sérum des sujets infectés. Loyacano et *al.*, (2002) rapportèrent une relation non significative avec l'infestation cependant des taux de gestation plus élevés (67 vs 54%) ont été rapportés chez les génisses de boucherie sous contrôle répété du flukicide par rapport à des contrôles non traités.

Bien que régie par des facteurs très divers, la reproduction autrement dit la fécondité des vaches laitières parasitées par *Fasciola hepatica* en est affectée, cela a été constaté par de nombreux chercheurs tels que Cawdery et *al.*, (1971). Cette diminution se remarque surtout lorsque l'invasion des canaux biliaires par les jeunes douves coïncide avec la période de conception du fœtus (Cawdery et Conway, 1971). Une autre étude de ce paramètre a également été faite par Mage et *al.*, (1989) après un traitement des animaux puis des parcelles contre *Fasciola hepatica* ou son hôte intermédiaire, alors qu'initialement le taux de réussite en première insémination n'était que de 38%, après une année de traitement douvicide, ce taux est considérablement amélioré. Il l'est encore un peu plus après assainissement des pâtures. Parallèlement, le pourcentage de vaches à 3 inséminations décroît de 48% à 11% une fois tous les traitements en place. Par ailleurs, on obtient une annulation du nombre de métrites dès la mise en place du traitement douvicide.

Il a été démontré que l'infestation influe également sur la qualité du lait sachant que le foie intervient dans la synthèse des protéines et des lipides, on peut s'attendre à une baisse des taux protéiques et butyreux (matières grasses) chez des animaux ayant un foie douvé qui se répercuterait sur le gain de poids des agneaux et des veaux nourris par des brebis et des vaches. Une étude menée par Mage et Legarto (1986) montre qu'une faible infestation par la douve ne semble pas avoir d'effet significatif sur la production de lait

des vaches laitières. L'hypothèse d'une plus forte infestation nécessaire pour cela est émise par les auteurs de cet essai. En 1970, Ross évoquait l'effet de l'infestation par la douve sur la qualité et la quantité du lait produit. Selon lui, des vaches infestées produiraient 8% de lait en moins que des vaches saines ; Dargi (1975) a estimé la perte de lait de 90 à 300 kg par lactation annuel chez le bovin.

#### **IV.2.2. Production de la viande**

Le foie intervient dans les processus d'élimination des déchets de l'organisme : une perturbation de cette fonction ne peut que nuire au bon état et à la production de l'animal atteint. Il intervient dans la digestion par la sécrétion de la bile : une baisse de production (par diminution du nombre des hépatocytes et obstruction des canaux biliaires) engendre une mauvaise digestion entraînant une baisse de l'assimilation digestive (Dorchies et *al.*, 1981).

Le foie est aussi le carrefour des métabolismes glucidiques, lipidiques et protéiques. Son atteinte affecte directement les productions et notamment la croissance des animaux atteints. Cawdery et *al.*, (1977) ont montré que les infections subcliniques dérivant de 600 métacercaires, qui donnaient une infection moyenne estimée à 54 douves par animal 26 semaines après l'infection, ont réduit le gain de poids de 8% au cours des six premiers mois de l'infection ( $P < 0.05$ ). Après six mois, cette infection avait peu d'effet sur la performance. Des niveaux plus élevés d'infection (1000 métacercaires) réduit le gain de poids de 28% ( $P < 0.05$ ) et a provoqué l'apparition de signes cliniques chez certains animaux. De plus, à l'abattoir, une dépréciation de l'animal peut survenir avec une saisie du foie pour distomatose

#### **IV.2.3. Saisies des foies**

Les douves immatures traversant le parenchyme hépatique provoquent à leur passage une hépatite traumatique, et des lésions de cholangite chronique sont induites par la suite à l'état adulte des douves ce qui conduit à la saisie du foie au niveau des abattoirs.

En Algérie le parage partiel du foie est recommandé lors des infestations minimales, en raison de l'importance de la valeur marchande de cet organe, notant que l'association Américaine des vétérinaires parasitologue (1983) a estimé la saisie chaque année de foie de bovins aux Etats Unis d'Amérique à près de 1.5 millions.

## V. SIGNES CLINIQUES ET LESIONS

Dans le cas courant la symptomatologie de la fasciolose dépend du nombre de formes infestantes ingérées et de la durée de l'infestation. Les conséquences de l'infestation sont liées principalement aux conséquences de la migration des adoloscarias dans le parenchyme hépatique et à la présence des douves adultes dans les canaux biliaires. La migration intrapéritonéale ne s'exprime pas cliniquement. Elle peut cependant s'exprimer sous une forme aiguë ou subaiguë provoquée par la migration des douves immatures (phase d'invasion) ou sous forme chronique où les signes cliniques sont dominés par un syndrome d'anémie Lié au régime hématophage des douves adultes.

### V.1. Chez l'animal

#### \* Phase aiguë

Cette phase apparait 1 à 3 mois après l'infestation des jeunes bovins pâturant les zones humides de prairies très contaminées, la migration intra parenchymateuse des adolscaria va induire des lésions hépatiques importantes ce qui va conduire à un état de dénutrition avancé et une très grande sensibilité aux maladies parasitaires à tropisme digestif cette forme s'observe après juillet et s'aggrave en novembre et décembre. Elle correspond à la migration des douves immatures dans le parenchyme hépatique et dure 2 à 3 mois. Les symptômes en sont: fièvre, troubles digestifs, diarrhées, vomissements, nausées, perte d'appétit et perte de poids, douleur de l'hypochondre droit, hépatomégalie. Il peut y avoir apparition d'une fibrose voir d'une cirrhose.

Des manifestations allergiques comme l'apparition d'une urticaire et de l'œdème de Quincke sont signalées (Andriamanantena et *al.*, 2005) ainsi que des manifestations respiratoires (Fabre et *al.*, 2001). Celles-ci sont parfois dues aux localisations erratiques de la douve. La rupture de la capsule de Glisson provoque un écoulement de liquide dans le péritoine, responsable d'une ascite (Asrat, 2004). Cette phase est caractérisée par une hyperéosinophilie importante (qui peut dépasser 1000/mm<sup>3</sup> de sang), une pâleur, une anémie et un ictère dus à une augmentation de bilirubine. S'il ya un polyparasitisme, la fasciolose peut entrainer la mort de l'animal (Beugnet, 2000b).

### **\*Phase subaiguë**

La phase subaiguë résulte d'une infestation massive et dans la plupart des cas la mort survient 8 à 10 semaines après l'infestation (Urquhart et *al.*, 1989). Cette phase présente les mêmes symptômes que ceux de la phase précédente (comme l'anémie, la pâleur) avec aussi perte de poids et douleurs abdominales (Mage, 2008).

### **\*Phase chronique**

Elle apparaît à la fin de l'hiver et au début du printemps et représente la phase la plus longue. Cette phase s'observe 3 mois après l'infestation et correspond à la présence des douves adultes dans les canaux biliaires (Andriamanantena et *al.*, 2005). Les parois de ces derniers sont détruites ce qui entraîne une hyperplasie des épithéliums voire une cholangite s'accompagnant de colique hépatique (Dunn, 2003). Les autres signes observés sont: diarrhée, fièvre irrégulière, amaigrissement, anémie et ictère avec apparition d'un œdème sous maxillaire appelé : signe de la bouteille (Kaufmann, 1996) (figure 15).



**Figure 15:** Signe de bouteille chez les bovin (Meyer C, 2020).

Une augmentation des enzymes hépatiques comme les phosphatases alcalines est observée, l'hyperéosinophilie est absente ou moins élevée que lors de la phase aiguë (Ryan et *al.*, 2002). Parfois les zones nécrosées offrent des sites favorables pour la prolifération des bactéries telle que *Clostridium perfringens* responsable d'une hépatite toxi-infectieuse connue sous le nom de «Black disease» (Euzéby, 1998). Dans la forme chronique les douves adultes provoquent de la cholangite par le traumatisme. Un appel important de cellules inflammatoires (leucocytes, plasmocytes, éosinophiles, fibroblastes) constitue le début de cette cholangite. Par la suite, l'épithélium des canaux biliaires est

hyperplasié ou disparaît par nécrose. Le processus de fibrose apparaît au niveau des canaux biliaires dont les parois deviennent épaisses au détriment de la lumière canaliculaire. Les canaux biliaires deviennent visibles à la surface du foie. La fibrose progresse de façon diffuse dans tout le parenchyme et caractérise l'aspect marbré et la consistance cirrhotique du foie. De nombreuses controverses ont été émises sur l'origine de l'anémie fasciolienne. selon Sewell et *al.*, (1966), Tous les auteurs s'accordent sur l'origine hématophagique des douves adultes en ce qui concerne l'anémie chronique fasciolienne. Cette anémie normocytaire et normochrome au début devient à la longue macrocytaire et hypochrome. Dans cette forme chronique de la fasciolose, on a une persistance des perturbations humorales observées dans la phase subaiguë avec une forte hypoalbuminémie. Les perturbations des fonctions hépatiques sont à l'origine de nombreuses manifestations telles que la perte de poids, l'apparition d'oedème en zone déclive, particulièrement le signe de la bouteille dans la région de l'auge. Selon Oakley et *al.*, (1979) la fasciolose provoquerait une chute de la fécondité des animaux. La pathogénie révèle que la fasciolose peut être très mortelle en forme aiguë, mais provoque d'énormes pertes de productivité dans les formes subaiguës et chroniques. Ceci nous amène à porter une attention sur l'importance de la maladie.

### **V.1.1. Répercussions hépatiques**

Les foies douvés saisis en abattoirs présentent classiquement un aspect hypertrophié (cirrhose) avec des trajets fibrosés (Dawes, 1970). Ces lésions macroscopiques ont trois origines possibles

#### **\* Fibrose post-nécrotique**

C'est la cicatrice laissée par les adolescarias durant leur migration ; le tissu noble du foie est remplacé par du tissu fibreux. Le bovin a une réaction fibreuse particulièrement développée; cela peut constituer un obstacle à la migration lors d'infestations ultérieures(Dawes, 1970).

#### **\* Nécrose et la fibrose post-ischémique**

Elles sont localisées dans les zones périphériques aux trajets des douves dans le parenchyme hépatique. L'ischémie est due à une invasion cellulaire des vaisseaux ainsi qu'à des localisations accidentelles de douves dans les vaisseaux. (Dawes, 1970).

### \* Fibrose péricanaliculaire

Elle correspond à la cholangite ou épaissement des canaux biliaires sans cesse agressés par les douves pour leur alimentation. Cette calcification est très marquée chez les bovins et peut même atteindre le tissu noble voisin. Ceci a pour conséquence de rendre difficile l'alimentation de la douve ; elle est amenée à se déplacer ou à mourir ; ce processus est réversible une fois la douve éliminée mais prend plusieurs mois. Les répercussions sur le foie de la présence de douves sont donc principalement une fibrose de l'organe ; ceci entraîne une gêne à la circulation sanguine dans les micro-vaisseaux ; on observe une hypertension artérielle ainsi que la genèse d'anévrismes. (Dawes, 1970).

### V.2. Chez l'homme

Chez l'homme la fasciolose évolue en quatre périodes cliniques (Chen et Mott, 1990 ; Mas-Coma et Bargues, 1997 ; Mas-Coma et *al.*, 1999b , 2000 ). La période d'incubation va de l'ingestion de métacercaires à l'apparition des premiers symptômes. Chez l'homme, cette période n'a pas été déterminée avec précision (seulement «quelques» jours, six semaines, deux à trois mois, voire plus). La période invasive ou aiguë comprend la migration de douves jusqu'aux voies biliaires. La période de latence comprend la maturation des parasites et le début de la ponte. Cette période peut durer des mois, voire des années et la proportion de sujets asymptomatiques dans cette phase est inconnue. Elle est souvent découverte lors du dépistage familial après le diagnostic du patient (Arjona et *al.*, 1995). Les patients peuvent présenter une éosinophilie prédominante évoquant une infection, des troubles gastro-intestinaux ou une ou plusieurs rechutes des symptômes aigus. Enfin, la période biliaire, chronique ou obstructive peut se développer après des mois ou des années d'infection. De ces quatre périodes, les deuxième et quatrième sont les plus importantes car les patients sont presque toujours dans l'une ou l'autre de ces deux périodes au moment du diagnostic (Mas-Coma et *al.*, 2019).

**Tableau IV :** Caractéristiques des quatre cas de distomatose humaine à *F. hepatica*. HES (hyperéosinophilie sanguine), IEP (immunoélectrophorèse), PZQ (praziquantel) (Zait et Hamrioui, 2005)

N° d'ordre (année)	Age (sexe)	Clinique	HES	Diagnostic	Traitement	Evolution
1(1991)	10 ans (F)	Ictère	/	Œufs de <i>F. hepatica</i> les selles	PZQ	Guérison
2(1991)	20 ans (F)	Asymptomatique, d'où une enquête familiale	/	Œufs de <i>F. hepatica</i> dans les selles	PZQ	Guérison
3(1998)	42 ans (F)	Douleurs à l'hypochondre droit	50 %	3 arcs (IEP)	PZQ	Guérison
4(2003)	32 ans (M)	Asthénie, perte de poids, pâleur	80 %	2 arcs (IEP)	/	Décès

## VI. IMMUNITÉ

### VI.1. Réponses immunitaires à l'infestation par *Fasciola hepatica* :

Elles sont de trois ordres : immunité non spécifique ; immunité à médiation humorale, immunité à médiation cellulaire. Elles se traduisent chez les bovins par une résistance à la réinfestation, se manifestant par une diminution du pourcentage d'installation mais aussi par une plus faible taille moyenne des douves adultes (Haroun and Hillyer, 1986).

#### VI.1.1. Immunité non spécifique

Le bovin est un hôte permissif, lors de la primo infestation, seul 10% à 15% des métacercaires ingérés vont atteindre les canaux biliaires en tant qu'immatrice, où elles vont devenir adultes et pondre des œufs alors que chez le mouton il est de l'ordre de 20 % à 30 % (Boyce et al., 1987). De plus, la durée de vie des douves dans les canaux biliaires chez les bovins est relativement restreinte du fait d'un mécanisme tardif de défense entraînant l'élimination d'environ 80 % des douves installées dans les canaux 6 mois après l'infestation (Doyle, 1972). Elles meurent généralement toutes dans les 18 mois à 24 mois suivant l'infestation (Torgerson et Claxton, 1999 ; Chauvin et Weiyi, 2003; Chauvin A., 2005); ce qui explique l'état de prémunition de l'animal.

Chez les bovins, elle explique en partie la résistance à la réinfestation ; elle est constituée d'une part par le développement d'une fibrose périlobulaire post primo-infestation (elle gênerait la migration des douves immatures), d'autre part par la calcification des canaux biliaires gênant l'alimentation des douves adultes (Dow et al., 1967; Euzeby, 1971a).

Les bovins expriment une résistance partielle à la réinfestation, se manifestant par une diminution de l'intensité parasitaire et de la taille des douves (Haroun E.M. *et al.*, 1986 ; Chauvin A et Weiyi., 2003).

En plus, les bovins peuvent très bien ne pas exprimer de signes cliniques de fasciolose même après des infestations répétées contrairement aux ovins où ce mécanisme tardif de défense est inexistant ; ainsi les douves s'accumulent dans le foie des ovins au fur et à mesure des infestations et développent cependant une fasciolose clinique.(Donnadieu, 2001)

## **VI.1.2. Immunité spécifique à médiation humorale et cellulaire.**

### **VI.1.2.1. Réponse humorale**

L'immunité à médiation humorale a pour support antigénique les antigènes de surface, le tégument de *Fasciola.Hépatica* possède des cellules tégumentaires. Ces dernières libèrent des granules sécrétoires (Bennet C.E., 1975 ; Hanna R.E., 1980a; Hanna R.E., 1980b; Hanna R.E., 1980c) qui sont variables en fonction du stade du parasite. On note également des antigènes d'excrétion – sécrétion ou antigènes E-S qui sont d'origine de substances produites par le tube digestif du parasite. L'intérêt de ces données est d'ordre diagnostic, la recherche dans le sang des anticorps correspondants peut permettre en pratique de diagnostiquer une fasciolose ou de suivre l'évolution de la parasitose. La réponse humorale est généralement précoce.

### **VI.1.2.2. Immunité à médiation cellulaire**

L'immunité à médiation cellulaire peut être générale, elle est dans ce cas transitoire et présente de la 2<sup>ème</sup> à la 5<sup>ème</sup> semaine post-infestation, ou locale en rapport avec les différents lieux de présence des douves évoluant dans l'organisme du bovin-hôte (Moreau *et al.*, 1997). Localement, et d'une façon chronologique, les douves subissent une réponse immunitaire cellulaire dans la paroi intestinale ; d'après Wicky *et al.*, (1991), chez le bovin, la paroi intestinale parasitée se retrouve infiltrée fortement par des mastocytes muqueux et par des granulocytes éosinophiles. Ces derniers joueraient un rôle, d'après ces mêmes auteurs, dans la lutte contre une réinfestation. Dans la cavité péritonéale, les cellules intervenant contre les douves seraient majoritairement des granulocytes éosinophiles (Davies et Goose, 1991). Dans le parenchyme hépatique, les

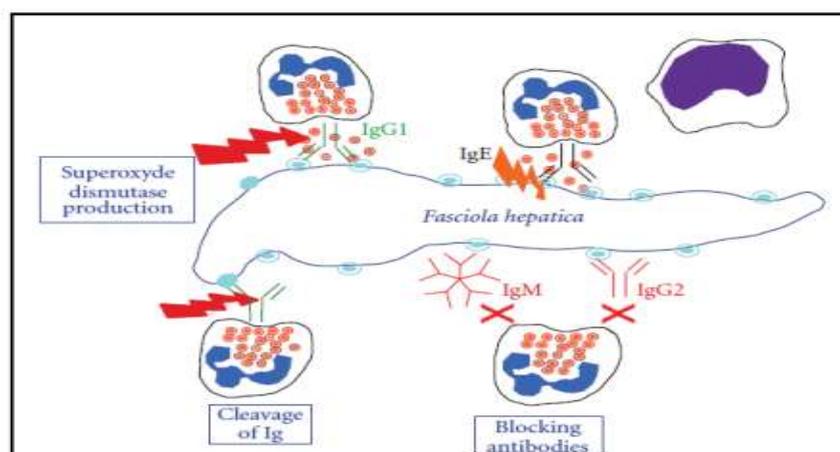
cellules impliquées sont principalement des macrophages, des lymphocytes et des granulocytes, là aussi principalement éosinophiles. Les mécanismes effecteurs de l'immunité anti-*Fasciola hepatica* ont été identifiés comme proches de ceux intervenant contre *Schistosoma mansoni* dans la schistosomose murine (Moreau et al., 1997). Ils sont de deux ordres

### A-Activation des macrophages par l'interféron gamma issu des lymphocytes T

Seule la réponse cellulaire intervient ici ; il y a production de NO, toxique pour le parasite, par le macrophage activé par l'interféron.

### B- Cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ou A.D.C.C.).

Ce mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) pourrait aussi être impliqué dans la destruction de *Fasciola hepatica*. Ainsi, les éosinophiles semblent adhérer aux douves en présence de sérum immun (Doy et Hughes, 1982). De plus, Van Milligen et al., (1998) ont noté que les douves nouvellement existées étaient rapidement recouvertes par des anticorps et étaient entourées par des éosinophiles quand elles traversaient la sous-muqueuse intestinale de rats immuns. Ces résultats suggèrent que les éosinophiles peuvent jouer un rôle dans la destruction des parasites via un mécanisme d'ADCC au niveau intestinal et probablement au niveau péritonéal.



**Figure 16:** Mécanismes d'échappement immunitaire de *F. hepatica* (Moreau et Chauvin, 2010).

## **VI.2. Echappement du parasite à la réaction immunitaire**

Cependant, *Fasciola hepatica* a développé plusieurs mécanismes pour échapper à l'ADCC à partir : (Figure 16)

- des produits d'excrétion-sécrétion ou PES telles que les cathepsines qui permettent le clivage des immunoglobulines IgE et IgG impliqués dans l'ADCC (Smith *et al.*, 1993) et le glutathion S-transférase (GST) qui neutralise les radicaux superoxydes. Ces produits peuvent aussi empêcher la stimulation des lymphocytes T (Moreau et Chauvin, 2010).
- du renouvellement d'une façon permanente des antigènes de surface.
- de l'activation polyclonale des IgG due à ce renouvellement, ce qui provoque un épuisement du système immunitaire (Donnadieu, 2001).
- des anticorps bloquants des IgM et IgG qui inhibent la fixation des cellules effectrices, notamment les éosinophiles, à la surface du parasite (Moreau et Chauvin, 2010). Les formes juvéniles se recouvrent par des IgM de l'hôte pendant la migration pour échapper au système immunitaire de l'hôte (Chauvin et Boulard, 1996).

## **VII. DIAGNOSTIC DE LA FASCIULOSE**

Le diagnostic de certitude est obtenu par la mise en évidence des œufs du parasite dans les matières fécales ou, plus rarement, dans la bile (tubage duodéal). La ponte peut être intermittente, ce qui nécessite plusieurs recherches en cas d'insuccès. On note aussi l'inspection des foies à l'abattoir qui représente un moyen d'investigation des plus sûrs quant à la présence ou l'absence de douve dans le foie. La quantité d'œufs éliminés est en général faible, ce qui rend obligatoire l'utilisation des techniques de concentration. Les œufs n'apparaissent qu'au bout d'environ 3 mois après la contamination. Pendant la période qui précède l'élimination fécale des œufs, seul est possible le diagnostic sérologique. De nombreuses techniques (immunofluorescence, hémagglutination indirecte, ELISA, PCR) sont disponibles (AFSSA., 2016).

### **VII.1. Diagnostic clinique**

Le diagnostic antémortem de la fasciolose est très difficile à établir du fait de l'absence de signe pathognomonique de la parasitose ou d'absence de symptômes ainsi il est très difficile de parler avec certitude de fasciolose surtout chez les bovins. Toutefois devant une anémie

nette, une baisse d'état générale et de production pouvant conduire à la cachexie nous guide vers le diagnostic de la maladie. Cependant, La diarrhée est rare, les formes chroniques sont les plus fréquentes chez les bovins. La forme aigue surtout chez les ovins entraîne souvent la mort avant l'apparition des symptômes (Beugnet, 2000a).

## **VII.2. Inspection des foies**

Elle comprend une observation superficielle du foie portant sur les faces viscérales et diaphragmatiques et une observation profonde à la coupe; la cholangite chronique est une inflammation des canaux biliaires, consécutive à une infestation prolongée ou répétée, due surtout à l'action mécanique et phlogogène de trématodes, soit des grandes douves (*F. hepatica*) adultes, localisées dans les canaux biliaires principaux, soit de petites douves (*Dicrocoelium dendriticum*) adultes dans les petits canaux biliaires (Le Net et al., 2005). Cependant dans de nombreuses régions, les deux infestations peuvent coexister chez les mêmes bovins (Dorchies et al., 1988; Bichet et al., 1998). Comme l'hépatomégalie, la fibrose, la nécrose et les abcès hépato-biliaires, ne sont pas des lésions pathognomoniques de la fasciolose bovine. L'inspection sanitaire retient le critère de la présence de douves vivantes ou calcifiées, il dépend de l'observation attentive des grands canaux biliaires par le vétérinaire d'abattoir, après deux ou trois incisions réglementaires de la face ventrale du foie. En cas de faible infestation (< 10 douves/foie), cette technique se révèle peu efficace pour détecter leur présence. Les faux négatifs sont donc fréquents comme l'ont observé les auteurs qui ont réalisé la dissection complète des foies (Gimard, 2001 ; Mekroud et al., 2006; Rapsch et al., 2006).

Un des problème majeur de cette inspection en abattoir consiste en l'absence fréquente d'information des éleveurs des motifs de saisie des foies, ou carrément au manque de sensibilisation des éleveurs concernant cette parasitose dans les zones où la fasciolose est encore enzootique ce qui conduit à un quasi-oubli de la fasciolose par les acteurs du terrain (Meissonnier et Mage, 2007).

## **VII.3.Diagnostic coproscopique**

Traditionnellement, les infections à la fasciolose ont été diagnostiquées en détectant des œufs dans les fèces (Anderson et al., 1999; Boray, 1985). Cependant, la période prépatente est de 8-10 semaines selon l'espèce hôte ; par conséquent, le nombre d'œufs

n'est utile qu'à partir d'environ 8 semaines après l'infection (wpi). En outre, d'autres facteurs tels que l'âge de l'hôte, la teneur en eau fécale et le nombre d'aliquotes testés par échantillon peuvent tous influencer sur la sensibilité du nombre d'œufs fécaux (FEC, revue par Alvarez Rojas, et *al.*, 2014). Des faux positifs peuvent survenir en raison de la rétention d'œufs dans la vésicule biliaire pendant au moins deux semaines après la réussite du traitement (Flanagan et *al.*, 2011). Les méthodes de sédimentation coprologique sont bien établies dans les laboratoires de diagnostic de routine, et des méthodes telles que FLOTAC (Cringoli, et *al.*, 2010) et Flukefinder (Foreyt, 2001) sont disponibles.

Au laboratoire d'analyses et au cabinet vétérinaire, le diagnostic coprologique reste la démarche indispensable pour identifier la présence d'œufs d'helminthes ou d'oocystes de protozoaires dans les prélèvements fécaux des bovins jeunes et adultes. La ponte des douves est sujette à des variations importantes, qui influent sur le degré apparent des infestations, tel que nous le fait apprécier la coprologie, l'absence de ces éléments parasitaires résulte de divers facteurs :

-Absence réelle d'infestation : dans ce cas les examens répétés demeurent toujours négatifs.

-Helminthose larvaire : le diagnostic coprologique sera défailant pendant la période prépatente (10 à 12 semaines) qui précèdent la maturité et les premières excréctions fécales d'œufs par les grandes douves.

-Immunité acquise par les individus infestés d'où il en résulte une inhibition du développement des vers.

-Trop faible teneur des fèces en éléments d'origine vermineuse : les œufs étant trop peu nombreux échappent à l'examen, d'où la nécessité de mettre en œuvre des procédés d'enrichissements qui consistent à concentrer le plus grand nombre possible d'œufs, dans la quantité la plus petite possible de matières fécales examinées.

### **VII.3.1. Sédimentation : méthode lente pour la recherche des œufs de trématodes**

#### **\*Méthode de Faust et Ingalls (1946)**

- Diluer 5 g de selles dans 300 ml d'eau glycérolée à 0,5%.
- Réaliser 3 sédimentations successives pendant 1h, 45min, 30min, en verre à pied, en jetant le surnageant.
- Examiner le culot de sédimentation.
- Recherche d'œufs de *Fasciola hepatica*.

#### **VII.3.2. Flottation méthode de Janeckso et Urbanyi (1931)**

Les œufs des parasites ont une densité supérieure à 1. Ils coulent en eau ordinaire. Si ces œufs sont mis en suspension dans un liquide au poids spécifique supérieur à 1, ces derniers vont flotter à la surface. Tous les œufs des trématodes flottent sur un liquide dont le poids spécifique varie de 1.10 à 1.20, à l'exception des œufs de *Fasciola hepatica* plus lourds ne flottent que sur des liquides au poids spécifique très élevé, notant comme exemple l'iodomercurate de potassium (I.M.P) qui a une densité de 1.44.

Le principe de la méthode est le suivant :

- Triturer 2 g de selles avec un peu de liquide d'enrichissement dans un bécher.
- Ajouter de l'I.M.P. jusqu'à 60 ml.
- Tamiser la suspension.
- Verser une partie de la suspension dans un tube à essai jusqu'à son sommet.
- Poser une lamelle sur le ménisque supérieur de la suspension, et les œufs en flottation, viennent s'y accoler.
- Après 30 min, enlever la lamelle et la poser sur une lame porte-objet.
- Examiner cette préparation comme pour un examen direct

Notons que le produit d'enrichissement (I.M.P) est très toxique, donc nécessite des précautions d'usage.

#### VII.4. Tests immunologiques (diagnostic immunologique)

De nombreuses techniques immunologiques ont été décrites avec une sensibilité, une reproductibilité et une rentabilité plus élevées. Des dosages immuno-enzymatiques indirects (ELISA) de détection d'anticorps ont été développés. La plupart des ELISA de détection d'anticorps sont basés sur des produits d'excrétion et de sécrétion (E/S), des cathepsines L protéases (CatLs), un groupe d'endopeptidases sécrétées en quantités abondantes par des cellules épithéliales de *Fasciola* sp. Immatures et adultes, ou une sous-fraction de produits E/S appelés antigène F2. Infection à *Fasciola* spp. est caractérisée par une augmentation de l'IgG spécifique du parasite, qui est normalement détectable à 4 semaines poste infection et atteint un pic entre 8 et 10 wpi (Martinez-Pérez, et al., 2014 ; Salimi-Bejestani et al., 2005 ). Alors que les tests de détection d'anticorps ont une excellente sensibilité, les anticorps peuvent rester dans le sérum pendant plusieurs mois après un traitement réussi.

Les anticorps sont sécrétés dans le lait, ce qui signifie que plusieurs tests d'anticorps sériques ont été adaptés pour utiliser des échantillons de lait individuels ou en vrac, fournissant des méthodes automatisées, rapides et moins coûteuses pour surveiller le statut infectieux des troupeaux laitiers. La plupart des tests montrent une bonne sensibilité et spécificité diagnostique et plusieurs tests ELISA sont disponibles dans le commerce pour détecter l'infection dans des échantillons de lait et de sérum (Tableau V).

**Tableau V.** Résumé des tests ELISA de détection d'anticorps disponibles dans le commerce pour le diagnostic de *Fasciola hepatica* chez les bovins

Tester	La source	Référence
<b>Test de vérification de la fasciolose</b>	Idexx, États-Unis	Kuerpick, Schnieder et Strube (2013)
<b>ELISA MM3-Sero</b>	BIO X Diagnostics, Belgique	Mezo, González-Warleta, Castro-Hermida, Muño et Ubeira (2010)
<b>SVANOVIR® ELISA</b>	Boehringer Ingelheim Svanova, Suède	Charlier, Duchateau, Claerebout, Williams et Vercruysse (2007 )

L'imprégnation du système immunitaire par les antigènes (Ag) helminthiques, s'accomplit surtout lorsque les parasites sont en contact intime avec les tissus, comme c'est le cas de *Fasciola*, qui a une phase de migration hépatique.

Le délai d'apparition des AC, témoins de l'infestation se situe entre la deuxième et la troisième semaine post-infectieuse. Leur cinétique présente une montée rapide de la courbe et les taux les plus élevés sont situés au cours des trois premiers mois, c'est-à-dire pendant la période prépatente (Persan., 1974). Ceci n'est pas étonnant, car c'est à ce moment-là que les douves présentent des caractéristiques qui sont les plus favorables au développement de la réponse immunitaire.

-Migration dans l'intimité du parenchyme hépatique.

-Intense activité métabolique des adoloscarias et production massive de substances antigènes et immunogènes.

Pour la détection des AC, témoins de l'infestation des *Fasciola*, on utilise habituellement trois méthodes qui sont : l'hémagglutination indirecte (H.A.I), l'immuno-fluorescence indirect (I.F.I) et l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

#### **VII.4.1. L'hémagglutination indirecte (H.A.I)**

Hemagglutination indirecte est une technique qui a longtemps été utilisée pour le dépistage de la fasciolose tant pour les ovins (Jemli et *al.*, 1991) que pour les bovins. Néanmoins, une étude comparative avec l'ELISA montre que la seconde méthode est plus spécifique (98% de positivité contre 86%).

#### **VII.4.2. Immunofluorescence indirect (IFI)**

L'immunofluorescence indirecte est basée sur l'utilisation successive de 2 anticorps : le premier anticorps de type monoclonal reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt qui est l'antigène recherché. Ensuite, on utilise un deuxième anticorps de type polyclonal, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire (dirigé contre l'isotype de l'anticorps primaire, il s'agit alors d'une antiglobuline).(Letonturier, 2007).

### VII.4.3. L'E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Sorbent Assay)

La méthode immuno-enzymatique ELISA, de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide, est un examen de laboratoire. Cette méthode est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique ELISA permet, en plus, un dépistage plus précoce à savoir la deuxième semaine au lieu de la troisième (Cornelissen et *al.*, 1992).

Ce test entre dans le cadre général des EIA (enzymes immunoassays), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie.

L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. L'un des deux est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par le substrat chromogène ou fluorogène. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps, que pour détecter la présence d'un antigène (Figure 17).

#### Principe de base :

Les étapes de l'ELISA dit indirect, la plus couramment utilisée, pour déterminer la concentration en anticorps du sérum sont:

**1\***L'application d'un échantillon d'un antigène connu sur une surface, le plus souvent celle d'un puits d'une plaque de microtitration. L'antigène est fixé à la surface, de façon à le rendre immobile

**2\***Le recouvrement des puits (ou toute autre surface) par les échantillons de sérum à tester (ou tout autre solution à tester).

**3\***Le rinçage de la plaque, de façon à retirer les anticorps non-liés. Après rinçage, seuls les complexes antigène-anticorps demeurent attachés à la surface du puits.

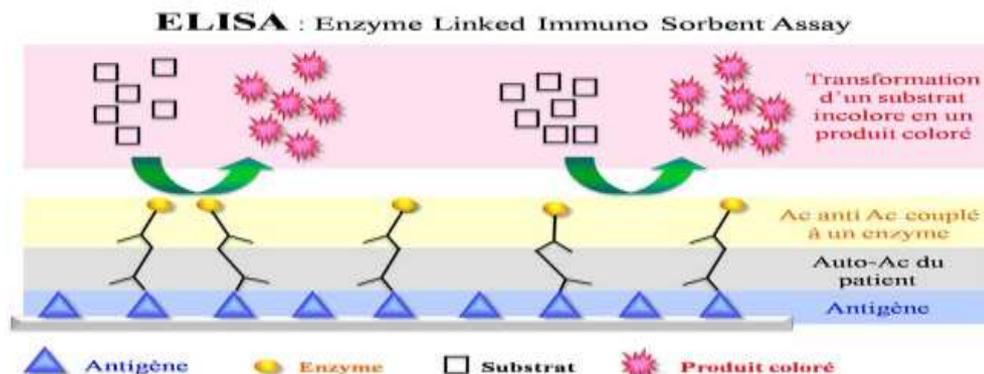
4\*L'ajout aux puits des anticorps secondaires qui se lieront à l'anticorps primaire, (il s'agit dans ce cas d'une antiglobuline). Ces anticorps secondaires sont couplés à l'enzyme modifiatrice de substrat qui permet de suivre l'évolution de la réaction.

5\*Le second rinçage de la plaque, de sorte à éliminer les anticorps non liés.

6\*L'application d'un substrat qui, s'il est converti par l'enzyme, émet un signal chromogénique ou fluorescent.

7\*La quantification du résultat, à la vue ou, le plus souvent, par spectrophotométrie ou tout autre appareil d'optique.

L'enzyme agit comme amplificateur : quand bien même peu d'anticorps conjugués à l'enzyme seraient attachés, l'enzyme catalyserait la formation de nombreux signaux, ce qui rend ce test très sensible, mais augmente également le nombre de faux positifs, il faut donc, comme d'habitude, prévoir des puits de contrôle.



**Figure 17** : Principe de la technique immunologique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (7)

#### **a- Diagnostic immunologique à partir du lait**

Les méthodes sérologiques ont été également utilisées en France par Boulard et *al.* (1985), puis par Pourquier et *al.* (1995) à partir des laits individuels et des laits de tank, selon des techniques d'analyses et d'interprétation très comparables à celles indiquées précédemment pour les sérums sanguins. Boulard et *al.*, (1985) soulignèrent le progrès de cette démarche dans les élevages laitiers par rapport à l'inspection des foies en abattoirs et au diagnostic coprologique, bien que la sensibilité des tests réalisés sur le

lactosérum soit un peu inférieure à celle des tests sur le sérum (Boulard et Regnault, 1989; Pourquier et *al.*, 1995).

Cette démarche analytique a été rapidement appliquée en contrôles de routine par les laboratoires interprofessionnels laitiers, pour dépister les troupeaux laitiers infestés par la grande douve, et pour informer les éleveurs de la présence de cette infestation dans leur troupeau. Reichel et *al.*, (2005) attirent l'attention sur le manque de sensibilité des analyses effectuées sur les laits de tank, lorsque la séroprévalence de la fasciolose est faible chez les vaches laitières. Cette situation est également constatée par Salaun (2005) dans le département de la Mayenne où la recherche d'anticorps anti-f2 réalisée sur des laits de tank est très souvent négative, malgré des situations enzootiques de fasciolose dans les troupeaux laitiers. Le mélange et la dilution des laits individuels diminuent la valeur prédictive positive des analyses immunologiques. Le résultat négatif de l'analyse d'un lait de tank ne doit pas être interprété dans l'absolu, mais en fonction des résultats antérieurs dans le troupeau. En cas de doute, deux démarches diagnostiques sont possibles: soit l'analyse d'un ou plusieurs sérums sanguins de mélange par lot de vaches laitières randomisées, soit celle d'un ou plusieurs lactosérums de mélange issus des mêmes vaches.

#### **b- Diagnostic sérologique à l'aide de l'antigène f2**

Levieux et *al.*, (1992 a,b) développent une méthode sérologique quantitative pour détecter les anticorps anti-protéine **f2**, témoins spécifiques de l'infestation des bovins par *Fasciola hepatica*. L'Institut Pourquier met au point une méthode ELISA de type «double sandwich» indirect. Pour chaque puit de la plaque ELISA, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'antiglobuline liée à l'enzyme qui, elle-même, est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le sérum à tester. La densité optique (DO) de la coloration est mesurée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm. Elle est comparée à la DO d'un sérum de référence négatif (sans anticorps) et de deux sérums de référence positifs P.

### **c- Diagnostic sérologique à l'aide d'un produit antigénique d'excrétion-sécrétion (ES)**

Boulard et *al.*, (1985) appliquent une méthode ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) sur des sérums et des laits individuels de vaches laitières de quatre troupeaux infestés par *Fasciola hepatica*. L'antigène sélectionné est un produit d'excrétion-sécrétion (ES) de grandes douves recueillies en abattoir. Ultérieurement, Boulard et Regnault (1989) montrent que les réponses sérologiques individuelles chez les bovins expérimentalement infestés par des doses répétées de métacercaires sont variables, d'un bovin à l'autre, mais précoces (2 à 4 semaines après l'infestation expérimentale), et atteignent un plateau à partir de la dixième semaine après l'infestation. Une analyse plus détaillée des antigènes ES de *Fasciola hepatica* a été réalisée par la technique de l'immuno-empreinte (Chauvin et *al.*, 1995). Elle permet d'évaluer qualitativement l'intensité de la réaction immunitaire due à chaque antigène. Parmi les 17 antigènes ES, huit induisent des anticorps qui reconnaissent aussi des antigènes autres que ceux de *F. hepatica*, chez les moutons infestés expérimentalement. Il s'agit des protéines de 12, 15, 27, 28,5, 30, 41 et 56 kDa. Les réactions les plus constantes concernent la protéine de 28,5 kDa contre laquelle les animaux réagissent spontanément dès le jour de l'ingestion des métacercaires et de manière beaucoup plus intense, à partir de la 6<sup>ème</sup> ou 7<sup>ème</sup> semaine après l'infestation (Chauvin et *al.* 1995). Différentes équipes de recherche ont réalisé des tests sérologiques à l'aide d'antigènes ES, en général, sur des effectifs limités de bovins infestés expérimentalement ou naturellement par des grandes douves adultes, excrétrices d'œufs. Cette méthode révèle une excellente sensibilité, mais sa spécificité est limitée par les possibles réactions croisées des antigènes ES avec des anticorps induits par des trématodes (*Paramphistomum* sp. et *Dicrocoelium dendriticum*), autres que *F. hepatica*. (Chauvin et *al.*, 1995).

#### **VII.4.4. L'immunoélectrophorèse (I.E.P)**

Cette technique met en jeu une séparation des protéines par électrophorèse dans un gel d'agarose suivie d'une double diffusion contre des Ac spécifiques selon une direction perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique. Chaque zone d'équivalence correspond à un précipité Ag-Ac qui se traduit par un arc de précipitation.

L'immunoélectrophorèse permet de caractériser ou d'identifier des antigènes (ce n'est pas une méthode quantitative) (Gross et März, 1988).

#### **VII.4.4.1. Immunoélectrophorèse simple**

On peut combiner l'immunodiffusion avec d'autres techniques pour en augmenter la spécificité ou obtenir des informations plus complètes sur les molécules avec lesquelles on travaille. Développée il y a plus de 40 ans (Grabar et Williams, 1953), l'immunoélectrophorèse simple (IES) est une technique où l'on combine l'électrophorèse en gel d'agarose et l'immunodiffusion.

En premier lieu, on fait migrer un mélange de protéines dans un gel d'agarose pour les séparer, ensuite, on dépose un antiserum dans une tranchée creusée dans le gel parallèlement à la direction de migration. On laisse diffuser. Les protéines reconnues par les anticorps apparaîtront comme des arcs de précipitation disposés le long de la tranchée et positionnés à la distance à laquelle la protéine aura migré durant l'électrophorèse. Si l'antiserum contient des anticorps contre plusieurs protéines présentes dans le mélange, un complexe d'arcs apparaîtra (Devall, 1984). C'est une technique est peu utilisée en recherche de nos jours. Sa simplicité lui conserve cependant des applications cliniques à des fins diagnostiques.

#### **VII.5. Diagnostic moléculaire**

Des méthodes de diagnostic moléculaire ont été développées pour augmenter la sensibilité et la spécificité des diagnostics conventionnels. Martínez-Pérez, et *al.*, (2012) ont développé une PCR nichée capable de détecter l'infection dans les fèces de moutons dès 2 wpi en amplifiant un fragment de 423 pb du cytochrome C oxydase 1 gène. Robles-Pérez, et *al.*, (2013) ont également détecté l'infection à 2 wpi mais par une PCR conventionnelle, qui prend moins de temps, et en amplifiant un fragment de 292 pb du gène ITS2. Ayaz et *al.*, (2014) ont comparé la prévalence de *F. hepatica* chez les bovins et les buffles utilisant la FEC et une méthode PCR; les auteurs ont montré la plus grande sensibilité de la technique moléculaire. En outre, pour différencier les espèces, *F. hepatica* et *F. gigantica*, une PCR multiplex en une seule étape a été développée pour la détection simultanée en utilisant des échantillons fécaux (Le et *al.*, 2012); les deux

espèces se chevauchent dans certains pays d'Afrique et d'Asie et ont une morphologie similaire, ce qui rend difficile l'identification à partir d'échantillons fécaux.

L'un des inconvénients de la PCR est que cette technique n'est disponible que dans des laboratoires spécifiques en raison du besoin d'équipement spécialisé. Il existe également des problèmes de reproductibilité entre les laboratoires, les méthodes publiées ne fonctionnant souvent pas dans d'autres laboratoires de diagnostic. Pour ces raisons, l'amplification isotherme à médiation en boucle (LAMP) a été étudiée comme une alternative à la PCR. Le test LAMP est une procédure d'amplification génique très spécifique, efficace et rapide dans laquelle la réaction peut se dérouler à une température constante (Notomi, 2000). Martínez-Valladares et Rojo-Vázquez (2016) ont mis au point un test LAMP pour détecter l'ADN de douves dans les fèces de mouton et ont comparé les résultats avec une PCR conventionnelle.

### **VIII. Traitement et résistance anthelminthique :**

Un certain nombre d'antihelminthiques sont homologués pour l'utilisation chez les ovins et les bovins, notamment le triclabendazole, un dérivé du benzimidazole, l'albendazole, le closantel et le clorsulon. Unique parmi ces médicaments, TCBZ démontre une grande efficacité contre les parasites adultes et les douves immatures dès le 2<sup>ème</sup> jour suivant l'infection (Boray et *al.*, 1983), tandis que les autres flukicides ciblent uniquement les douves de 6 à 14 semaines après la contamination (Kelley et *al.*, 2016). En conséquence, TCBZ est devenu le médicament de choix, en particulier pour le traitement de la fasciolose aiguë chez les moutons, mais cette dépendance excessive au TCBZ a inévitablement entraîné l'émergence de résistances au TCBZ (TCBZ-R). La menace de la résistance au TCBZ-R qui pèse sur le contrôle futur des infections par la douve du foie était au centre d'une récente étude qui résume le nombre de cas signalés dans le monde entier depuis le premier rapport de TCBZ-R en Australie en 1995. (Kelley et *al.*, 2016 ; Overend et Bowen, 1995). À ce jour, il y a 20 rapports de TCBZ-R examinés par les pairs sur les élevages de moutons en Europe (Tableau VI) (Beesley et *al.*, 2018), plus un certain nombre de rapports anecdotiques de résistance. Il n'est pas clair si les rapports d'échec de traitement sont enregistrés par des systèmes de surveillance de médecine vétérinaire et si oui, si ces données sont disponibles dans le domaine public ? Cette

information est plus que primordiale et nécessaire pour fournir la preuve de la large répartition de la résistance dans le monde et pour donner une image claire du statut TCBZ-R au niveau de l'exploitation individuelle, pour s'assurer que les mesures de contrôle les plus efficaces sont utilisées.

**Tableau VI.** Rapports publiés par des pairs sur le TCBZ-R chez les moutons en Europe  
(adapté par Kelley et *al.*, 2016 )

Année	Pays	Nombre fermes	Références
1998	Écosse	1	(Mitchell et <i>al.</i> , 1998)
2000	Les Pays-Bas	1	(Gaasenbeek et <i>al.</i> , 2001); (Moll et <i>al.</i> , 2000)
2000	Pays de Galles	1	(Thomas et <i>al.</i> , 2000)
2006	Espagne	1	(Alvarez-Sanchez et <i>al.</i> , 2006)
2009	République d'Irlande	1	(Mooney et <i>al.</i> , 2009)
2011	Écosse	1	(Sargison et Scott., 2011)
2012	Pays de Galles et Écosse	7	(Daniel et <i>al.</i> , 2012)
2012	Écosse	2	(Gordon et <i>al.</i> , 2012)
2015	Irlande du Nord	5	(Hanna et <i>al.</i> , 2015)
<b>Nombre total fermes sur lesquelles rapporté</b>		20	

L'une des contraintes pour déterminer l'étendue totale du TCBZ-R est l'absence d'un test diagnostique rapide et fiable pour détecter la résistance sur le terrain. Toutes les études présentées dans le tableau VI, ont utilisé la méthode du test de réduction du nombre d'œufs fécaux (FECRT) pour identifier la résistance en se basant sur une réduction de <95% du nombre d'œufs 21 jours après traitement par TCBZ. Plus récemment, le test de réduction du coproantigène a été favorisé mais nécessite encore une validation dans les études de terrain (Kelley et *al.*, 2016). Des essais d'éclosion des œufs in vitro ont été utilisés pour détecter la résistance à l'albendazole et au triclabendazole.

Des outils moléculaires pour détecter les marqueurs TCBZ-R dans les échantillons de terrain fourniraient des données précises permettant de cibler des traitements efficaces et de réduire le risque que les parasites TCBZ-R se déplacent d'une ferme à l'autre dans un cheptel infecté.

#### IV. Développement du vaccin :

Actuellement le contrôle principal de *F. hepatica* repose essentiellement sur l'utilisation de médicaments antihelminthiques. Compte tenu de l'évolution et des changements climatiques, de la prévalence croissante de l'infection et le nombre limité de flukicides disponibles, on se retrouve devant un besoin urgent de méthodes de lutte alternatives (Beesley et *al.*, 2018). Au cours des deux dernières décennies, les vaccins ont été considérés comme une stratégie alternative prometteuse et économiquement viable pour lutter contre la fasciolose du bétail (McManus et Dalton, 2006, Molina-Hernández et *al.*, 2015 ; Toet et *al.*, 2014). De nombreuses études de vaccin potentiel contre la fasciolose ont été menées sur des animaux de laboratoire comme les rats, les souris et les lapins (Meemon et Sobhon, 2016), et chez les ruminants (bovins, ovins et caprins) qui cependant requièrent plus de moyens.

Le niveau de protection requis pour augmenter la production de bétail constitue une question cruciale pour un vaccin commercial contre la fasciolose. Des pertes de production sont observées chez les moutons présentant 30 à 54 douves (Dargie, 1987), dans les troupeaux présentant des charges faibles et élevées, une protection de 50% et 80%, respectivement, serait suffisante (Toet et *al.*, 2014). Des études de modélisation récentes ont indiqué qu'un vaccin entraînant une réduction de la charge de douves de 43%, mais protégeant 90% du troupeau et durant une saison complète, aurait un impact important sur le contrôle de la maladie. (Turner et *al.*, 2016). De nombreux vaccins prototypes, bien qu'ils aient un effet variable sur la charge de la douve, ont un effet significatif sur la production d'œufs et la viabilité des œufs. D'où plus d'attention est nécessaire pour évaluer ces effets dans les essais de vaccins.

Une meilleure compréhension du mécanisme de la réponse protectrice contre *Fasciola* spp chez les ruminants est essentielle pour bien comprendre comment développer et administrer les vaccins (Molina-Hernández et *al.*, 2015). La durée de l'immunité protectrice est importante pour le succès commercial d'un vaccin, mais peu d'informations sur la longévité de la réponse protectrice sont disponibles à partir d'essais expérimentaux. Des études de modélisation ont montré qu'une protection qui dure toute une saison de pâturage est nécessaire pour qu'un vaccin soit commercialement viable (Turner et *al.*, 2016). L'âge des animaux protégés est également pertinent puisque les agneaux et les veaux sont mis au pâturage entre un et deux mois. Par conséquent, pour

qu'un vaccin soit viable, il devrait être efficace chez les jeunes animaux ainsi que chez les animaux âgés et, à ce jour, la plupart des essais vaccinaux ont porté sur les ovins et les bovins de plus de 4 mois.

Une variété d'antigènes purifiés natifs ont été utilisés dans des essais de vaccins chez les bovins et les moutons, y compris les protéines de liaison aux acides gras natives (FABP) induites à 55% chez les bovins contre *F. hepatica* ; la cathepsine native L1 (CL1) a induit une protection de 42% à 69% chez les bovins et une protection de 34% chez les moutons; la glutathion S-transférase native (GST) induisait 57% de réduction du ver chez les moutons et 0% -69% de protection chez les bovins. La leucine aminopeptidase native (LAP) a induit une protection de 89% chez les moutons (Toet et *al.*, 2014 , Yap et Smooker, 2016 ). Ces résultats prometteurs doivent encore être validés dans des essais ultérieurs et dans des essais sur le terrain.

## **B\**DICROCOELIUM DENDRITICUM***

### **I. Présentation du parasite : *Dicrocoelium dendriticum***

La Dicrocœliose est une maladie parasitaire répandue en pâturage chez les ruminants causée par *Dicrocoelium* spp. (Trematoda, Dicrocoeliidae), communément appelé «douve» ou «petite douve du foie».

Ce parasite vit dans les canaux et canalicules biliaires et la vésicule biliaire des ruminants domestiques et sauvages (moutons, chèvres, bovins, buffles, chevreuils, chameaux). Il affecte occasionnellement les lapins, cochons, chiens, chevaux et les humains de façon accidentelle. Son cycle biologique nécessite deux hôtes intermédiaires, le premier étant un e limnée qui permettra la formation des cercaires, le second est une fourmi chez laquelle les cercaires se transformeront en métacercaires qui représentent la forme infestante pour l'hôte définitif (Otranto et Traversa, 2002).

#### **I-1. Place dans la systématique**

*Dicrocoelium dendriticum* est un ver plat Trématode digène, à corps non segmenté faisant donc partie des Plathelminthes, encore appelé *Dicrocoelium lanceolatum* ou petite douve du foie. Visible à l'œil nu, la petite douve appartient à la classe des Trématodes et à la sous-classe des Digènes (possède deux Ventouses, l'une lui permettant de se nourrir, l'autre de se fixer au niveau des canalicules biliaires) (Bussiéras et Chermette, 1995). La ventouse ventrale se situe sur la moitié antérieure de la face ventrale, ce qui caractérise les Distomes. Elle possède un ovaire en arrière des testicules, elle fait donc partie de la famille des Dicrocoeliidés. La disposition inter cœcale des testicules et la localisation ante-acétabulaire du pore génital sont caractéristiques de la sous-famille des Dicrocoeliinés. Le genre *Dicrocoelium* est caractérisé par la situation de l'ovaire et des glandes vitellogènes dans le tiers moyen du corps (Bussiéras et Chermette, 1995).

Enfin, l'espèce *Dicrocoelium dendriticum* est définie par son œsophage bien visible ; son ovaire nettement plus petit que les testicules, disposés sur une ligne oblique ; sa ventouse ventrale un peu plus large que sa ventouse buccale ; son testicule antérieur n'atteignant pas la région pré-acétabulaire ; ses cœcums dépassant en arrière les vitellogènes ; ses vitellogènes tangents extérieurement aux cœcums (Bussiéras et Chermette, 1995).

## I.2. Morphologie de l'adulte :

*Dicrocoelium dendriticum* possède un corps aplati dorso-ventralement, homogène, ayant une forme d'une petite feuille, plus étroite en avant, mesurant 6 à 10 mm de longueur sur 2 à 3 mm de largeur maximale. Son tégument mince, est dépourvu d'écailles et d'épines, et joue un rôle important d'absorption et d'excrétion. Il possède deux ventouses musculieuses circulaires : une buccale, lisse, à l'extrémité antérieure, entourant l'orifice buccal et une ventouse ventrale ou acétabulum qui contrairement à la ventouse buccale n'est pas perforée et ne joue qu'un rôle de fixation. Le tégument du parasite est translucide laissant voir tous les organes, des œufs sombres, un utérus très développé, formant de fines ramifications (Bourgat et *al.*, 1975).

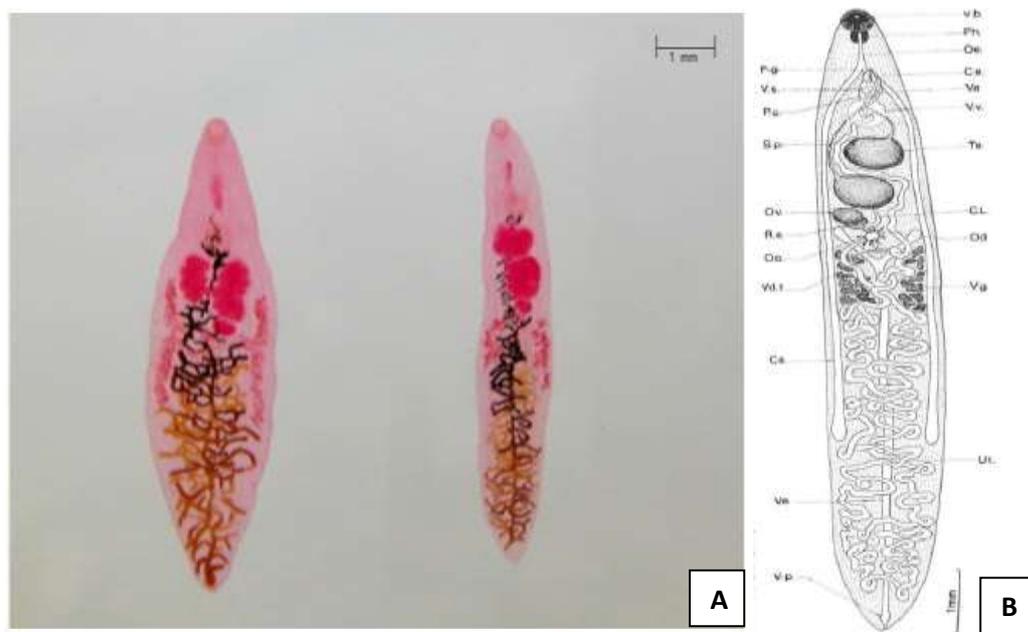
**Son tube digestif**, débute par une bouche subapicale ventrale. Le pharynx (120 à 150µm) est suivi d'un œsophage fin (23µm). Possède des caecums non ramifiés subégaux atteignent le tiers postérieur du corps, où ils se renflent légèrement.

**Appareil génital mâle** : les deux testicules globuleux, à bords entiers, situés immédiatement en arrière de l'acetabulum, sont disposés en tandem ou légèrement obliques, leurs dimensions varient de 540 à 820 µm pour le premier et de 500 à 1040µm pour le deuxième (Bourgat et *al.*, 1975) .

**Appareil génital femelle** : l'utérus, très développé et ramifié, occupant les 2/3 postérieurs du parasite est rempli d'œufs brun marron, ellipsoïdes, légèrement asymétriques, mesurant 35 à 45 µm sur 22 à 30 µm. Ces œufs ont une coque épaisse, pourvue d'un petit opercule à l'un des pôles et renferment, au moment de la ponte, un miracidium ovoïde, massif, occupant la totalité de la place. L'embryon porte plusieurs rangées de cils à l'un des pôles ainsi que deux vésicules plus claires au pôle opposé, ces deux « taches oculaires » étant facilement repérables au microscope, permettent ainsi une diagnose aisée des œufs de petite douve (Bussiéras et Chermette, 1995 ; Euzeby, 1971b ; Bourgat et *al.*, 1975) .

L'ovaire (220 à 450µm), globuleux et blanchâtre, occupe une position immédiatement post-testiculaire. il est ventral, médian, ou le plus souvent, paramédian à droite ou à gauche (Bourgat et *al.*, 1975).

Les glandes vitellogènes (660 à 1600 µm) sont peu développées et se situent dans le tiers moyen du corps (Figure 18).



**Figure 18 :** (A) Micrographies claires de *Dicrocoelium chinensis* (à gauche) et de *D. dendriticum* (à droite) marqués au carmin. Avec mise en évidence de la taille globale et l'orientation des testicules (Otranto et al., 2007). (B) : *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907. Face ventrale. Ca. : caecum ; C.d. : canal déférent ; C.e. : canal éjaculateur ; C.L. : canal de Laurer ; G.M. : glandes de Mehlis ; Od. : oviducte ; Oe. : œsophage ; Oo. : ootype ; Ov. : ovaire ; P.C. : poche du cirre ; P.g. : pore génital ; Ph. : pharynx ; R.s. : réceptacle séminal ; Te. : Testicule ; Ut. : utérus ; V.b. : ventouse buccale ; Vd.t. : vitelloducte transverse ; V.e. : vessie excrétrice ; Vg. : vitellogenes ; V.p. : vésicule pulsatile ; V.s. : vésicule séminale ; V.v. : ventouse ventrale (Bourgat et al., 1975).

### I.3. Biologie

#### I.3.1. Habitat

*D. dendriticum* vit, à l'état adulte, dans le parenchyme hépatique au niveau des canaux et canalicules biliaires ainsi que dans la vésicule biliaire des hôtes définitifs (Euzéby, 1971b). Sa petite taille et sa plasticité lui permettent de s'immiscer dans les plus fines ramifications des voies biliaires et ainsi très souvent échappée au diagnostic au niveau des abattoirs surtout chez les bovins où Cette localisation en profondeur semble être préférée (Alzieu et al., 1996). Le parasite peut également se trouver à la sortie du pancréas, au niveau du canal pancréatique (Ducháček et Lamka, 2003). Des localisations erratiques, extra biliaires, notamment dans les centres nerveux, restent très rares (Euzéby, 1971b).

#### I.3.2. Nutrition

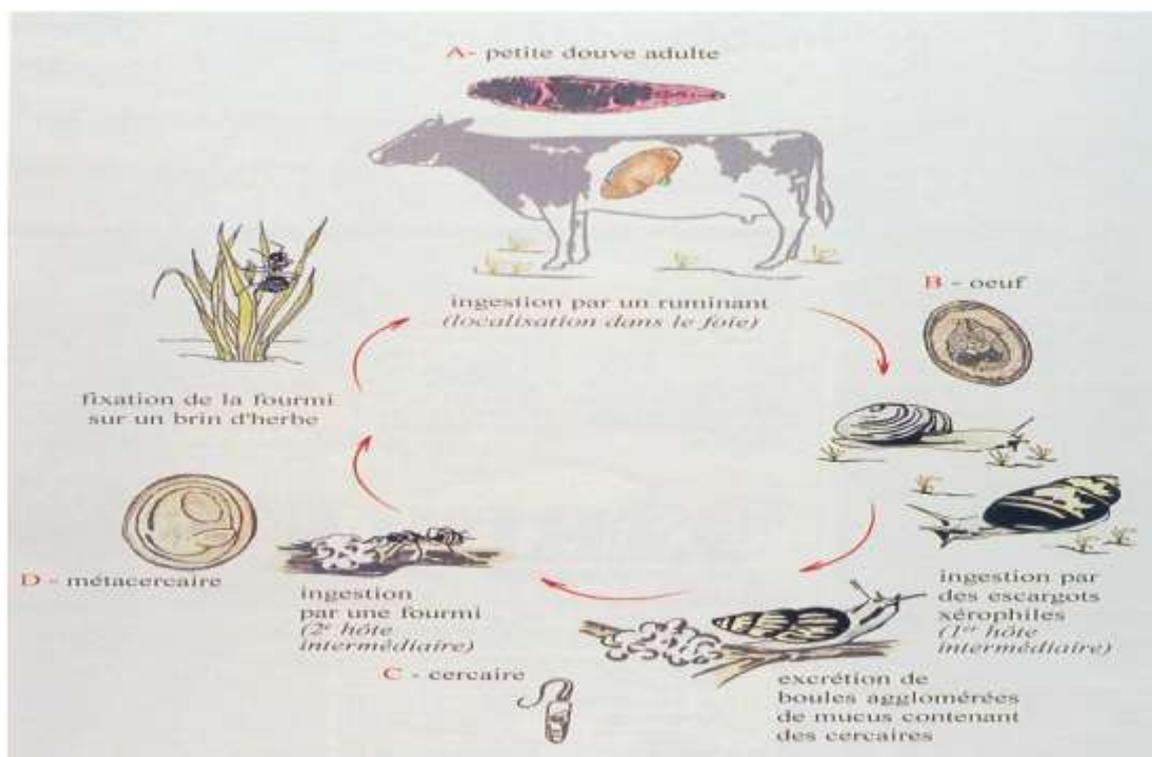
*D. dendriticum* est Biliphage, il se nourrit de cellules épithéliales biliaires desquamées et de mucus. La digestion fait intervenir des cellules intestinales qui fonctionnent comme

des glandes holocrines. Les éléments non assimilés sont rejetés par la ventouse buccale donnant à la bile de l'animal parasité une couleur sombre voir noire très pathognomonique de la pathologie.

Son mode d'alimentation biliphage lui confère un faible pouvoir pathogène d'une part, mais malheureusement le laisse à l'abri des substances médicamenteuses passant dans le sang, ainsi l'efficacité d'un traitement de la dicrocoélie reste très délicat (Euzeby, 1971b).

### I.3.3. Cycle évolutif

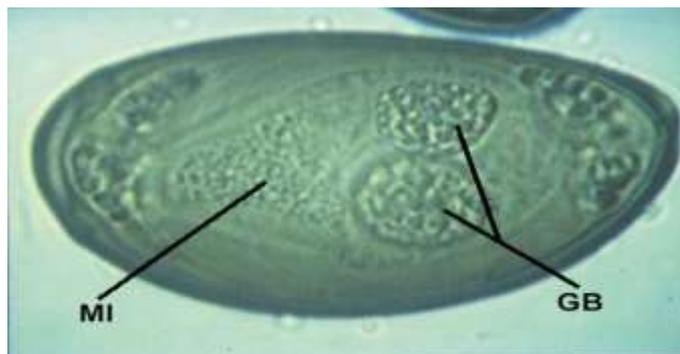
Le cycle évolutif de *Dicrocoelium dendriticum* (figure 19) est connu depuis les études de Krull et Mapes (1952) qui est particulièrement compliqué du fait de l'existence d'un deuxième hôte intermédiaire dans le cycle exogène de la dicrocoélie. Cette hypothèse de l'existence d'un deuxième hôte intermédiaire était longtemps restée controversée car la ressemblance du parasite avec la grande douve laissait penser que leurs cycles évolutifs étaient certainement très proches voir identique. Ainsi son cycle est particulièrement compliqué puisqu'il met en jeu deux hôtes intermédiaires, un gastéropode terrestre et une fourmi. Il est de type **Triheteroxene (Figure 19)**.



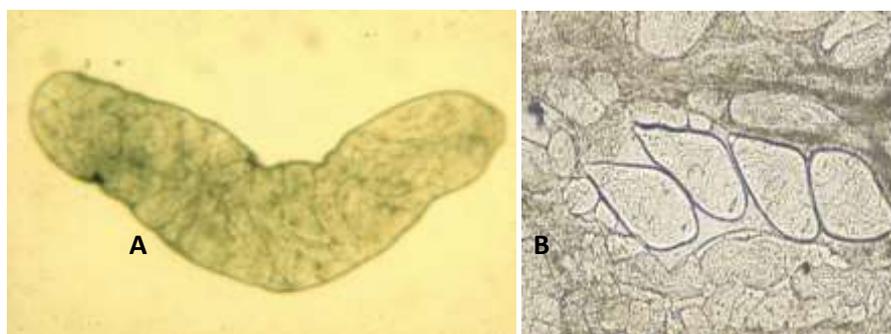
**Figure 19** : Cycle évolutif de *Dicrocoelium dendriticum* (bulletin des G.T.V., 1996)

Pendant de nombreuses années, les escargots étaient considérés comme les seuls hôtes intermédiaires (Mattes, 1936 ; Neuhaus, 1936). Depuis les études de Krull et Mapes (1952) ont démontré le rôle de *Formica* spp. comme deuxième hôte intermédiaire, qui a été confirmé par la suite par de nombreux auteurs (Hohorst et Laemmler, 1962).

Chez les mollusques, les stades larvaires évoluent au bout de 3 à 4 mois environ, à partir des miracidies (MI) ingérées par les escargots avec les œufs (Figure 20) qui se transforme en sporocystes de première et deuxième génération (SP1, SP2). Ces derniers représentent les stades de multiplication asexuée (Figure 21). De nombreuses cercaires (CE) se développent à partir des SP2 et quand elles atteignent complètement leurs maturité (Figure 21, B), elles migrent de l'hépatopancréas jusqu'aux cavités pulmonaires à l'aide de leurs queues, produits enzymatiques et les stylets à l'intérieur de leurs ventouses orales.

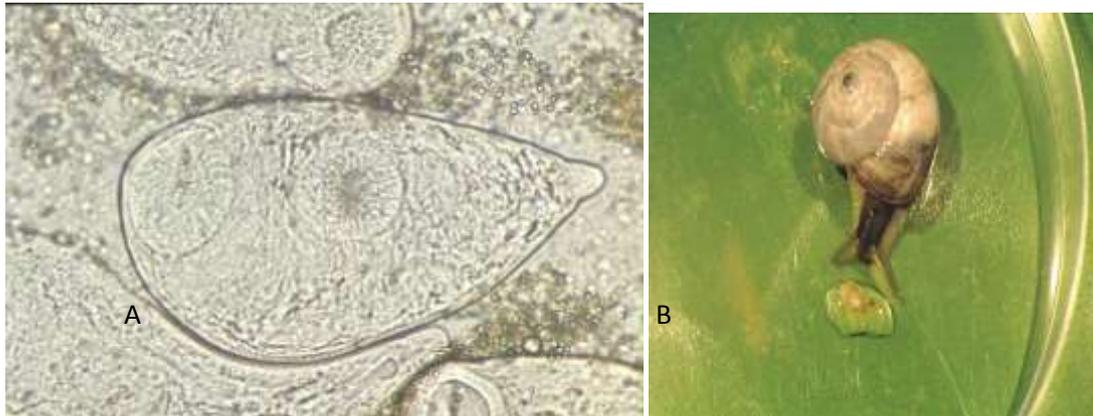


**Figure 20:** œuf operculé de *Dicrocoelium dendriticum* contenant un miracidium (MI) avec deux boules germinales (GB). (Otranto et Traversa, 2002)



**Figure 21 :** (A) sporocyste fille de *Dicrocoelium dendriticum* contenant des cercaires, (B) sporocystes filles avec cercaires en maturation. (Otranto et Traversa, 2002)

Les CE sont ensuite expulsées des escargots dans des grappes d'au moins 5000 CE enveloppées dans des boules de mucus (Figure 22), qui sont ingérées par les fourmis (à savoir, *Formica fusca*, *F. pratensis*, *F. rufibarbis*) (Figure 23) et deviennent des métacercaires (ME) en 1 à 2 mois.



**Figure 22:** (A) détail de la cercaire de *Dicrocoelium dendriticum* avec le développement de la queue et des ventouses orales et ventrales, (B) *Cernuella virgata* avec des boules de bave nouvellement excrétées (Otranto et Traversa, 2002)



**Figure 23:** Fourmi se nourrissant de boules de bave (Otranto et Traversa, 2002)

Un ou deux ME peuvent être localisées dans le ganglion sous œsophagien de la fourmi (ver de cerveau) et provoquer une crampe cataleptique lorsque la température est inférieure à 15°C, ce qui provoque une paralysie des fourmis qui se retrouvent bloquées sur le bout des herbes, les rendant plus facilement ingérables par les ruminants durant le pâturage.

Dans les hôtes définitifs, les ME une fois libérées des fourmis grâce à l'action des enzymes duodénales vont migrer vers le petit, puis vers les plus gros canaux biliaires et vers la vésicule biliaire via le cholédoque sans migration parenchymateuse dans le foie. Ils deviennent ainsi matures adultes et se reproduisent par hermaphrodisme ou insémination croisée (Krull, 1958).

Les œufs sont rejetés dans l'environnement dans les matières fécales, avec une période pré-patente d'environ 2 mois.

#### A. Les hôtes définitifs

L'hôte définitif est un herbivore ruminant, en particulier les petits ruminants domestiques (ovins, caprins et bovins) (Bussiéras et Chermette, 1995), ou sauvages, comme les mouflons, les chamois ou encore les chevreuils (Ducháček et Lamka, 2003). Seulement d'autres animaux peuvent se révéler être atteints de la maladie tels que le porc, les équidés Hazlett et *al.*, (2018) ont rapporté une Infection hépatique à *Dicrocoelium dendriticum* chez un cheval miniature), les léporidés (lapins de garenne notamment), le singe (Ducháček et Lamka, 2003), et très rarement les carnivores. Les oiseaux étant exceptionnellement parasités (Ducháček et Lamka, 2003).

L'Homme est considéré comme hôte accidentel, susceptible d'être infesté, mais de façon beaucoup moins fréquente qu'avec *Fasciola hepatica* du fait de l'ingestion des fourmis. (Euzéby, 1971b). Comme pour la fasciolose l'espèce la plus sensible reste les ovins contrairement au caprins et bovins qui semblent être plus résistants avec des charges parasitaire et de nombre d'EPG différents (Jithendran et Bhat, 1996).

D'autres facteurs de risque de la parasitose tels que l'âge, le sexe et la race des animaux sont susceptibles de faire varier la sensibilité de l'animal vis-à-vis de la dicrocœliose. Certains auteurs ont enregistré une EPG moyenne plus élevée ( $367,6 \pm 50,9$ ) chez les agneaux que chez les adultes (Manga-Gonzalez et *al.*, 1991) et chez les bovins âgés de moins de 2 ans que chez les animaux plus âgés, avec une légère diminution graduelle avec l'augmentation de l'âge de l'hôte (González-Lanza et *al.*, 1993). Par contre, une autre enquête a indiqué une augmentation du nombre de bovins infectés 24,2% chez les veaux de moins de 18 mois, à plus de 70% chez les animaux de plus de 6 ans (Ducommun et Pfister, 1991). Ces résultats peuvent indiquer que l'âge des animaux infectés pourrait influencer le taux de production d'œufs, bien que d'autres investigations soient nécessaires sur ce sujet (Manga-Gonzalez et *al.*, 1991).

## B. Les hôtes intermédiaires

### \*Premier hôte intermédiaire

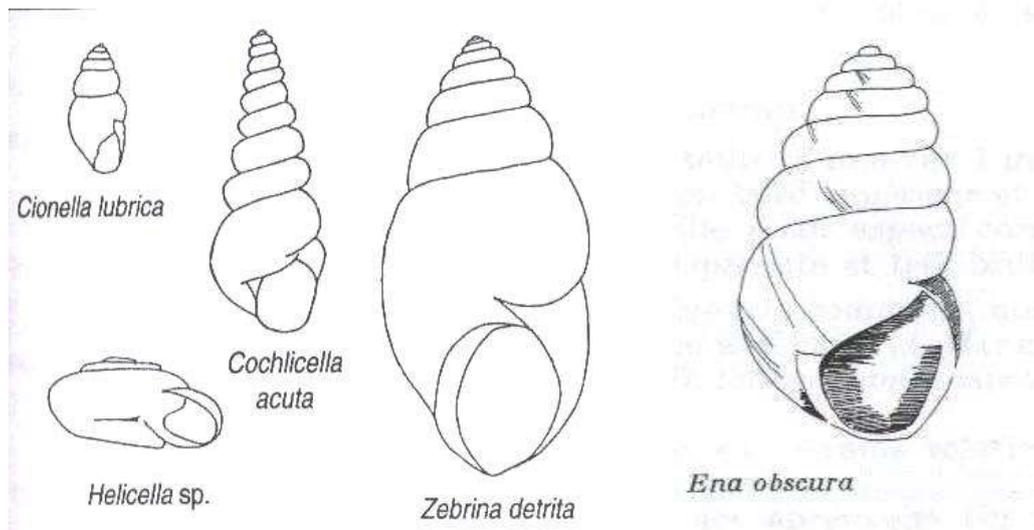
Plus de 90 espèces de mollusques ont montré une possibilité de jouer le rôle d'hôte intermédiaire dans ce cycle évolutif du *Dicrocoelium*. Il s'agit de gastéropodes pulmonés, appartenant à des espèces terricoles toutes plus ou moins xéothermiques, voir quelques fois très xérophiles, appartenant à l'ordre des Stylommatophores. Parmi eux on note ceux à répartition mondiale Tel que *Cochlicopa lubrica*, tandis que d'autres sont régionales (*Helicella corderoi* en Espagne, *Zebrina hohenackeri* au Caucase, *H. obvia* en Allemagne, *Ceruoella virgata* en Italie, Espagne et Turquie) (Manga-González et al., 2001 ; Fasanella et al., 1995).

En France, les espèces les plus souvent rencontrées dans le cycle de *D. dendriticum* sont *Cochlicella acuta* et *Helicella ericetirum*, de la famille des Hélicidés (Bussiéras et Chermette, 1995). Il est cependant très vraisemblable que les espèces *Zebrina*, *Ena*, *Cochlicopa* interviennent également dans le cycle (Euzeby, 1971b).

*Helicella ericetirum* possède une coquille blanche jaunâtre, ornée de bandes ; sa coquille mesure 20 mm de diamètre pour 10 mm de hauteur. Il vit sur des terrains chauds et secs et pond à l'automne.

*Cochlicella acuta* mesure 20 mm sur 7 mm ; sa coquille possède un sommet mousse et une ouverture ovale, oblique ; elle porte des stries longitudinales, a une coloration blanchâtre et possède une bande sub-périphérique. Très commune en France, *Cochlicella acuta* vit sur des terrains secs et chauds.

La prevalence de *D. dendriticum* chez les mollusques hôtes intermédiaires a montré une plus grande infestation des spécimens âgés par rapport au plus jeune (34.77 et 3.77%, respectivement) (Manga-González et al., 2001 ; Schuster, 1993)(Figure 24).



**Figure 24 :** Aspect des coquilles des différents mollusques intervenant dans le cycle de *Dicrocoelium dendriticum* (Bussiéras et Chermette, 1995 ; Euzeby, 1971b)

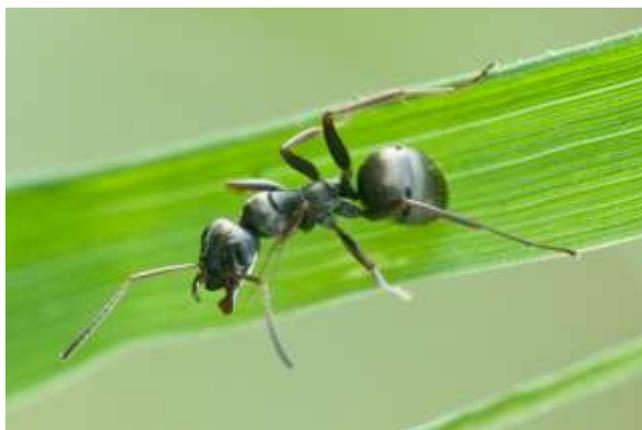
#### \* Deuxième hôte intermédiaire

Il s'agit de quelques espèces de fourmis appartenant au groupe des *Formica*, de la famille des Formicid s de la sous-famille des Euformicin s sous genre *Serviformica* : ce sont des fourmis de couleur noire ou brune, présentes sous les pierres.

*Formica fusca* est une fourmi de 4 à 8 mm, à corps terne, qui niche sous terre, sous des pierres ou du bois mort (Bussiéras et Chermette, 1995) elle est surtout active en été (Figure 25).

*Formica rufibarbis*, est de la même taille que *F. fusca*, mais de couleur rouge p le sur la tête et le thorax, et noire sur l'abdomen. Elle niche dans les bruyères sablonneuses et sèches, dans les prairies ainsi que dans les champs cultivés (Euzeby, 1971b).

En France, des métacercaires de *Dicrocoelium dendriticum* ont été trouvées chez *Formica fusca*, *Formica rufibarbis* (Alzieu et al., 2002) ainsi que chez *Formica cunicularia* et *Formica nigricans* dans une étude menée dans le Limousin (Badie, 1987).



**Figure 25: *Formica fusca* (8)**

## **II. EPIDEMIOLOGIE**

### **II.1. Répartition géographique :**

L'épidémiologie de la dicrocélieose dépend de l'environnement et de la présence ou non de ses deux hôtes intermédiaires et de son hôte définitif, c'est une maladie cosmopolite, présente sur tous les continents. L'absence de ce parasite dans certains pays peut s'expliquer par des conditions climatiques empêchant la vie des hôtes intermédiaires, ou du fait d'absence d'études réalisées sur le parasite (exemple de l'Algérie où aucune donnée concernant ce parasite n'est disponible, ainsi que sa petite taille le rendant difficilement diagnostiqué au niveau des abattoirs). Pour les facteurs environnementaux on note qu'une hygrométrie trop élevée est défavorable à la présence du premier hôte intermédiaire de la parasitose qui a tendance à préférer les aires sèches. (Juracek et Dubinsky., 1993). Cependant plusieurs espèces sont responsables de la dicrocélieose, en Afrique équatoriale, l'espèce responsable est *Dicrocoelium hospes*. En Europe, *Dicrocoelium dendriticum* est présente dans tous les pays mais, en Grande-Bretagne, elle semble relativement rare. La dicrocélieose bovine est donc une parasitose de pâtures sèches, d'évolution enzootique. L'infestation des bovins a lieu majoritairement de mai à octobre (Baudin M, 2005). En effet, la contamination des hôtes définitifs est facilitée lors de conditions climatiques alternant des périodes sèches et chaudes et des épisodes de pluies. L'humidité est en effet nécessaire à la survie de mollusques et constitue un facteur déclenchant l'émission des cercaires. Les œufs de *Dicrocoelium* craignent également une chaleur excessive. Les années de forte sécheresse ne sont donc pas les plus favorables à l'expression de la Dicrocélieose (Baudin M, 2005).

## II.2.prévalence :

*Dicrocoelium dendriticum* est l'espèce la plus commune présente en Europe, au nord de l'Asie (chine), Japan , l'Afrique du nord , Amerique du sud et dans certain point en Amérique du nord et en Australie ; en tant qu'espèce moins commune *Dicrocoelium hospes* a été signalé en Afrique (looss,1907 ; malek, 1980) et *Dicrocoelium chinensis* en Chine (Tang et Tang, 1978).

Cringoli et *al.*, (2002) ont montré que 53,1% des élevages bovins sont positifs vis-à-vis de *dicrocoelium* à partir d'échantillons de matières fécales, en Italie, (soit 16 % des animaux). Les résultats d'une enquête coprologique en France due à l'infestation par *Dicrocoelium dendriticum* dans les élevages de trois cantons en Haute-Saône, a révélé une la présence du parasite chez 43 bovins (soit 7,2% des animaux) issus de 15 élevages différents (soit 50% des cheptels prélevés).

D'après une étude d'Alzieu et Ducos de Lahitte en 1991 sur les suivis coproscopiques, on ne considère le caractère pathogène de *Dicrocoelium* qu'à partir de 300 Œufs par gramme (opg). Arbabi et *al.*, (2018) ont rapporté une prévalence de 0.77% en Iran avec des pertes économiques annuelles dûes à la saisie des foies à l'abattoir de 30479.2 USD.

Pour résumer, la charge parasitaire et l'excrétion d'œufs de *Dicrocoelium dendriticum* sont beaucoup moins importantes chez les bovins que chez les ovins, mais le pouvoir pathogène de ce parasite ne doit pas pour autant être négligé.

## III. La symptomatologie :

La symptomatologie chez les bovins est fruste voir asymptomatique et non caractéristique de la parasitose mais commun à plusieurs autres pathologie, d'après Alzieu et *al.*, (1996), on note principalement deux formes cliniques, à savoir la forme chronique et l'évolution puerpérale, qui serait peut être due au dysfonctionnement hépatique à cause des obstructions canaliculaires par les petites douves. D'autres études ont montré qu'une infestation de moins de 1000 *Dicrocoelium dendriticum* ne conduirait pas à des manifestations cliniques ni engendrait des pertes économiques (Rojo Vazquez

et *al.*, 1981 cité par Juliard, 2003). Cependant, ces dernières pourraient se manifester si la charge parasitaire dépasse 5000 vers

### **III.1. La forme chronique**

Il s'agit de la forme clinique la plus fréquemment rencontrée chez les bovins. On note principalement Une altération de l'état général et des performances : les animaux sont maigre avec Un pelage terne et piqué Des fèces souvent ramollies, une hypo albuminémie, De l'anémie et de l'œdème (Otranto et Traversa, 2003).

Cette pathologie est principalement rencontrée chez des sujets adultes. Cette phase chronique de la dicrocoélie correspond aux deux phases du cycle endogène du parasite. La phase d'invasion, qui correspond à la migration des larves dans le parenchyme hépatique, les coproscopies sont négatives durant cette phase mais on constate, chez les bovins, un abaissement des réserves glycogéniques hépatiques (Euzeby, 1971b). L'examen histologique du foie révèle une diminution des réserves glycogéniques hépatiques parallèlement à une teneur élevée en glycogène des tissus du parasite (Euzeby, 1971b). La phase d'état est quand à elle liée au passage des *Dicrocoelium* dans les canaux et canalicules biliaires où elles deviennent adultes. Cette phase engendre, de même, peu de symptômes. L'altération des performances pourra alors susciter une recherche de *Dicrocoelium dendriticum* dans les matières fécales des animaux concernés. En effet des œufs de *Dicrocoelium* peuvent, à ce stade et selon l'excrétion du parasite, être présents dans les fèces des bovins parasités (Baudin M, 2005). Des signes digestifs tels qu'un ramollissement des matières fécales peuvent être associés, ce syndrome de diarrhée chronique apparaissant le plus souvent en automne. La dicrocoélie est alors suspectée dans un élevage lorsque les autres pathologies responsables de diarrhée telles que la paratuberculose, la fasciolose, les strongyloses ou la BVD-MD (maladie des muqueuses) ont été écartées. Un traitement dicrocoelicide améliore rapidement l'état général de ces animaux.

### **III.2.le contexte puerpéral**

Ce contexte est essentiellement rencontré dans les élevages laitiers, les syndromes puerpéraux :

Il fait partie du syndrome « vache couchée », et associe une parésie à de l'anorexie dans la période entourant le vêlage. Cet état ne s'améliore pas après les traitements classiques

mis en place lors de parésie puerpérale, notamment des traitements par perfusion de solutés phosphocalciques et énergétiques. L'état général de l'animal ne peut en fait être imputé à aucune des fréquentes pathologies puerpérales appartenant au syndrome « vache couchée » (hypocalcémie, paralysie par écrasement des nerfs sciatique, fémoral ou obturateur lors du passage du veau, hémorragie)(Baudin M, 2005). Des complications peuvent se surajouter à la parésie et entraînent des troubles métaboliques ou des surinfections bactériennes allant parfois jusqu'à un tableau clinique de septicémie. L'abattage de l'animal est alors nécessaire. L'inspection post-mortem du foie révèle une fibrose modérée et une dilatation des canalicules biliaires avec présence de bouchons de *Dicrocoelium* dans certaines portions des voies biliaires hautes. Ce syndrome puerpéral est réduit lorsqu'un traitement préventif de la dicrocéliose est réalisé au tarissement. (Baudin M, 2005)

#### **IV. Diagnostic**

##### **IV.1. Diagnostic clinique (Ante –mortem)**

La dicrocéliose est une maladie parasitaire à symptomatologie fruste, voir asymptomatique dans quelques cas, sans présence de signe pathognomonique de la parasitose. Ainsi, il est très difficile voir impossible de poser un diagnostic clinique de la dicrocéliose bovine, l'identification est souvent des découvertes d'abattoirs.

Cependant quelques symptômes peuvent nous alerter et suspecter la présence du parasite chez l'animal à savoir (Alzieu et Ducos De Lahitte., 1991):

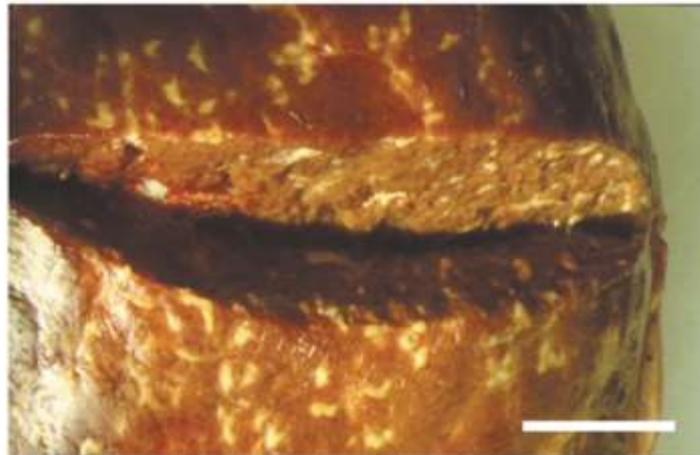
\*Un syndrome de diarrhée chronique, en automne surtout,

\*La présence de méléna, Un poil piqué, Un amaigrissement progressif, Des douleurs abdominales, Des vèlages anticipés, Des difficultés anormales au vèlage, un syndrome de parésie chez les vaches laitières, dès la parturition avec une cascade de problèmes où troubles métaboliques, surinfection bactérienne et septicémie s'entremêlent, Des chutes de production (Alzieu et Ducos De Lahitte., 1991)

Toutefois il s'agit d'une symptomatologie assez commune à de nombreuses pathologies se qui rend son diagnostic délicat.

#### **IV.2.-Diagnostic nécropsique (poste –mortem) :**

Le diagnostic de la dicrocoeliose a lieu le plus souvent suite à une analyse nécropsique lors de l'orientation des animaux infestés vers l'abattoir après éviscération et inspection du foie ,une bile épaisse et brunâtre s'écoule en cas d'infestation par la petite douve contenant des petit vers plats transparents d'environ un cm ; on les retrouve le plus souvent au niveau des canalicules biliaires contrairement à *Fasciola hepatica* qui se loge au niveau des gros canaux biliaires du fait de sa plus grande taille (Otranto et Traversa, 2003)(Figure 26).



**Figure 26 :** Foie ovin infecté par *Dicrocoelium dendriticum*. Le parenchyme s'est durci à la suite d'une fibrose grave et d'une calcification. Des conduits épaissis sont également présents (Otranto et Traversa, 2003)

#### **IV.3.Diagnostic coprologique: (voir partie *Fasciola hepatica*)**

La méthode la plus utilisée pour détecter *Dicrocoelium dendriticum* est une méthode indirecte, qui consiste à mettre en évidence les œufs du parasite présents dans les matières fécales des bovins. Les œufs de *Dicrocoelium* étant assez lourds, il convient d'utiliser une méthode particulière pour les mettre en évidence (Alzieu et Ducos De Lahitte., 1991 ; Courouble, 2004 cité par Baudin M., 2005)

Il faut tout de même rappeler que cette analyse ne peut être positive que si les parasites adultes pondent, c'est-à-dire au terme de la période prépatente. En phase d'invasion, il sera donc impossible de mettre en évidence le parasite par cette méthode.

### **\* Prélèvement**

Pour faire une bonne analyse coprologique, il faut avant tout effectuer un bon prélèvement.

Ainsi, les fèces sont récoltées directement dans le rectum de l'animal, afin d'être sûr que l'échantillon ne soit pas contaminé par l'environnement (Bourdeau et *al.*, 1983). Les échantillons doivent être individuels et en aucun cas mélangés. En effet, la dilution obtenue par le mélange ne permet plus de mettre en évidence des éléments peu nombreux, comme les œufs de petite et grande douve (Jacquet et Dorchies., 2002)

L'estimation de la dicrocœliose dans un troupeau nécessite le prélèvement d'au moins 10 bovins car seulement 20% des animaux parasités peuvent avoir une coproscopie positive (Levasseur, 2002). Le moment le plus propice pour mettre en évidence la dicrocœliose dans un élevage se situe de janvier à mars (Levasseur, 2002), l'excrétion des œufs de *Dicrocoelium* étant majoritaire pendant l'hiver. Enfin, Campo et *al.*, (2000) ont montré, chez les moutons, que l'excrétion des œufs de *Dicrocoelium* est plus importante l'après-midi.

#### **IV.4. La recherche des œufs de *Dicrocoelium dendriticum* dans la bile**

Braun et *al.*, (1995), ont rapporté que la mise en évidence des œufs de *Dicrocoelium dendriticum* est bien plus fiable lors de la recherche de ces derniers dans la bile, par rapport à la coproscopie. Avec une sensibilité pour la détection des œufs de *Dicrocoelium* de 27% contre 98% dans la bile. Les valeurs prédictives négatives étant respectivement de 81 et 96%. Quand on sait que les parasites adultes vivent et pondent pour une partie dans la vésicule biliaire, ces chiffres n'ont rien d'étonnant. Cependant, la méthode pour mettre en évidence les œufs de *Dicrocoelium dendriticum* dans la bile est assez délicate à réaliser en pratique courante. Braun et Gerber, (1992) ont décrit avec précision la technique de prélèvement de bile chez les bovins. Ils ont également vérifié par une étude expérimentale que cette méthode n'était pas dangereuse pour les animaux. Cette méthode consiste à ponctionner la vésicule biliaire sous contrôle échographique. La ponction a lieu entre les espaces intercostaux 7 et 12, après avoir visualisé l'ensemble de la vésicule à l'échographie. Les parasites et les œufs ayant tendance à sédimenter au fond de la vésicule biliaire, il faut injecter d'abord 10 ml de sérum physiologique avant de ponctionner la bile. De plus, avant d'inciser la peau et d'introduire l'aiguille, on peut

réaliser une anesthésie locale à la lidocaïne, ce qui permet d'éviter une réaction de l'animal suite à la ponction. Généralement, la ponction est facilement réalisable, surtout quand le manipulateur a un peu d'expérience. Toutefois, lorsque la vésicule biliaire est trop petite, il est souvent impossible de la ponctionner.

Braun et Gerber (1992), ont par ailleurs montré que cette ponction est sans danger pour les bovins : elle ne provoque pas de péritonite, seulement une légère hémorragie locale de la paroi intercostale pour 45% des animaux. L'appétit, le comportement et l'attitude des bovins restent inchangés dans les 10 jours qui suivent la ponction biliaire. Ainsi, la cholécystocentèse peut s'avérer utile pour les cas suspects de dicrocoélie ayant montré une coproscopie négative. Cependant, elle reste plus délicate à mettre en place en routine, car elle nécessite plus de temps et plus d'implication de la part du vétérinaire praticien.

#### **IV.5. La sérologie**

Des méthodes immunologiques pour la détection de la dicrocoélie ont été mises au point dans les 30 dernières années, comme alternative aux examens coprologiques et aux inspections post mortem du foie. De nombreuses techniques d'immuno-diagnostic, ainsi que l'immuno-fluorescence (Calamel, 1977 cité par Otranto et Traversa, 2002), précipitation, test d'hémoagglutination passive, fixation du complément et ELISA (Schröder et Geyer, 1976; Piergili Fioretti et al., 1980; Savitskii et Ponomareva, 1984; Jithendran et al., 1996) ont tous été utilisés pour détecter des anticorps anti-*Dicrocoelium* chez des animaux naturellement et / ou expérimentalement infectés.

Les produits somatiques (So) et les produits de sécrétion excrétrice (ESP) de *Dicrocoelium* ont été étudiés comme antigènes pour ELISA, et leurs caractéristiques chimiques ont été examinées à la fois par la réactivité biliaire (Wedrychowicz et al., 1995) et la réactivité sérum-anticorps. Les résultats ont montré que les protéines So et les molécules de surface de *Dicrocoelium* stimulent une réponse anticorps plus visible (Wedrychowicz et al., 1995), bien que des problèmes de faible spécificité et sensibilité pourraient survenir lors de l'utilisation d'extraits entiers de vers au lieu des antigènes ESP ou purifiés. D'autres auteurs ont rapporté une plus faible réactivité relative aux anticorps en utilisant les produits So plutôt que les antigènes ESP (González-Lanza et al., 2000).

Les titres d'anticorps contre *D.dendriticum* ont été étudiés par ELISA et comparés au nombre d'œufs chez les agneaux exposés à une infection naturelle ; une immunité aux

anticorps colostraux a été détectée 24h après la naissance et ont complètement disparu en 2 à 4 mois (Baldelli et *al.*, 1981). Après la première infection naturelle, 4 à 8 semaines avant l'apparition des œufs dans les fèces, un taux élevé d'anticorps anti-*D.dendriticum* a été détecté par ELISA, ce qui montre que ce test est efficace pour un diagnostic précoce de la dicrocoélie (Ambrosi et *al.*, 1980).

Une étude récente a grandement contribué à clarifier certains aspects du diagnostic immunitaire de la dicrocoélie. La réponse en IgG chez deux groupes de moutons infectés expérimentalement avec 1000 et 3000 ME ont été détectés par ELISA 19 et 23 jours plus tôt que les œufs dans les fèces. Les pics des titres d'anticorps étaient à 60 jours p.i. dans les deux cas et sont restés élevés jusqu'à la fin de l'essai (180 jours p.i.). Aucune différence significative n'a été détectée entre les titres d'anticorps et la charge de ME ; montrant qu'il n'y a pas de corrélation entre la charge parasitaire et la réponse immunitaire (González-Lanza et *al.*, 2000). La détection des anticorps anti *D.dendriticum* par la méthode ELISA est important pour les études séro-épidémiologiques et pour le diagnostic précoce de dicrocoélie chez les agneaux (les anticorps apparaissent 30 jours après infestation) conduisant à un traitement pour éviter les pertes économiques.

## **V. Prophylaxie et traitement**

Le contrôle de la petite douve du foie est difficile et peu efficace à ce jour en raison de la complexité de son cycle biologique et de son épidémiologie. Le contrôle repose principalement sur les pratiques d'élevage (éviter de pâturer tôt le matin ou tard dans la soirée, ce qui augmente l'infection par les fourmis) pour un meilleur contrôle des hôtes intermédiaires et du traitement des animaux (Otranto et Traversa, 2002). Comme dans les cas des vers pulmonaires et de la fasciolose (Cabaret et Galkin-Cabaret, 1985), La cartographie des sols devrait être évaluée et étudiée de manière à identifier la présence de sol calcaire qui représente l'habitat préférentiel du *D. dendriticum* (Otranto et Traversa, 2002).

Il a également été recommandé de recouvrir les fourmilières avec des branchages sur un périmètre d'un mètre autour de la fourmilière, les fourmis restant accrochées préférentiellement autour de celle-ci. (Juliard., 2003)

Les méthodes de contrôle des hôtes intermédiaires ne sont possibles que dans de petites zones, car leur coûts élevés empêchent leur utilisation généralisée (Otranto et Traversa,

2002). La destruction et le contrôle des hôtes intermédiaires par des produits chimiques n'est guère envisageable pour des raisons écologiques, leur coût étant, de plus, excessif. Les hôtes intermédiaires sont, en outre, difficiles à localiser sur le terrain, les escargots se réfugient dans les haies ou sous des pierres, les fourmilières sont enterrées sous une pierre ou des brindilles; l'utilisation de calcium cyanamide, de molluscicide et d'engrais chimiques, sont coûteux et sont souvent gênés par les conditions de sol difficiles. Cependant une autre option écologique est possible telle que l'introduction des dindes, des poulets, des oies et des canards dans de petits pâturages (environ 50 oiseaux par ha) pour manger des escargots et des fourmis(Otranto et Traversa, 2002).

En pratique, la prophylaxie dans les zones d'endémie repose sur un traitement stratégique de tous animaux exposés directement (par pâturage libre) à l'infection. Parmi les médicaments anthelminthiques, beaucoup de benzimidazole (albendazole, triclabendazole, fenbendazole, mébendazole, cambendazole, thiabendazole) et des dérivés de pro-benzimidazole (thiophanate) ont été utilisés contre *D. dendriticum*, à des doses plus élevées que celles utilisées contre les ténias, les douves, les nématodes pulmonaires et gastro-intestinaux (Onar, 1990).

L'Albendazole (ZAB), administré à des doses de 15 et 20 mg / kg par voie orale ou intraruminal, réduit la moyenne de la charge parasitaire du *D.dendriticum* de 98,2% et 99,6% respectivement, (Himonas et Liakos, 1980) alors qu'une dose unique de 10 mg / kg diminuait la charge parasitaire de 92,22% (Cordero, 1980).

Une augmentation des niveaux de production chez les animaux traités (2,56 kg de fromage et 0,6 kg de laine en moyenne de plus que le groupe témoin) a été également observée, ainsi qu'une réduction de la contamination des pâturages par les larves de nématodes.

Sur la base de l'épidémiologie du *Dicrocoelium* et de ses hôtes intermédiaires, les traitements sont suggérés deux ou trois fois par an au début du printemps et avant de loger les animaux en automne. Les troupeaux transhumants de brebis et de chèvres sont traités une fois qu'ils atteignent la vallée (Jithendran et Bhat, 1996).

À ce jour, aucune stratégie de vaccination contre la dicrocoélie n'a été étudiée, même si une réponse dépendante d'anticorps contre *D. dendriticum* a été enregistrée (Otranto et Traversa, 2002).

## *Chapitre II: Matériel et Méthodes*

## I. Matériel et méthodes

### I.1.Présentation de la zone d'étude

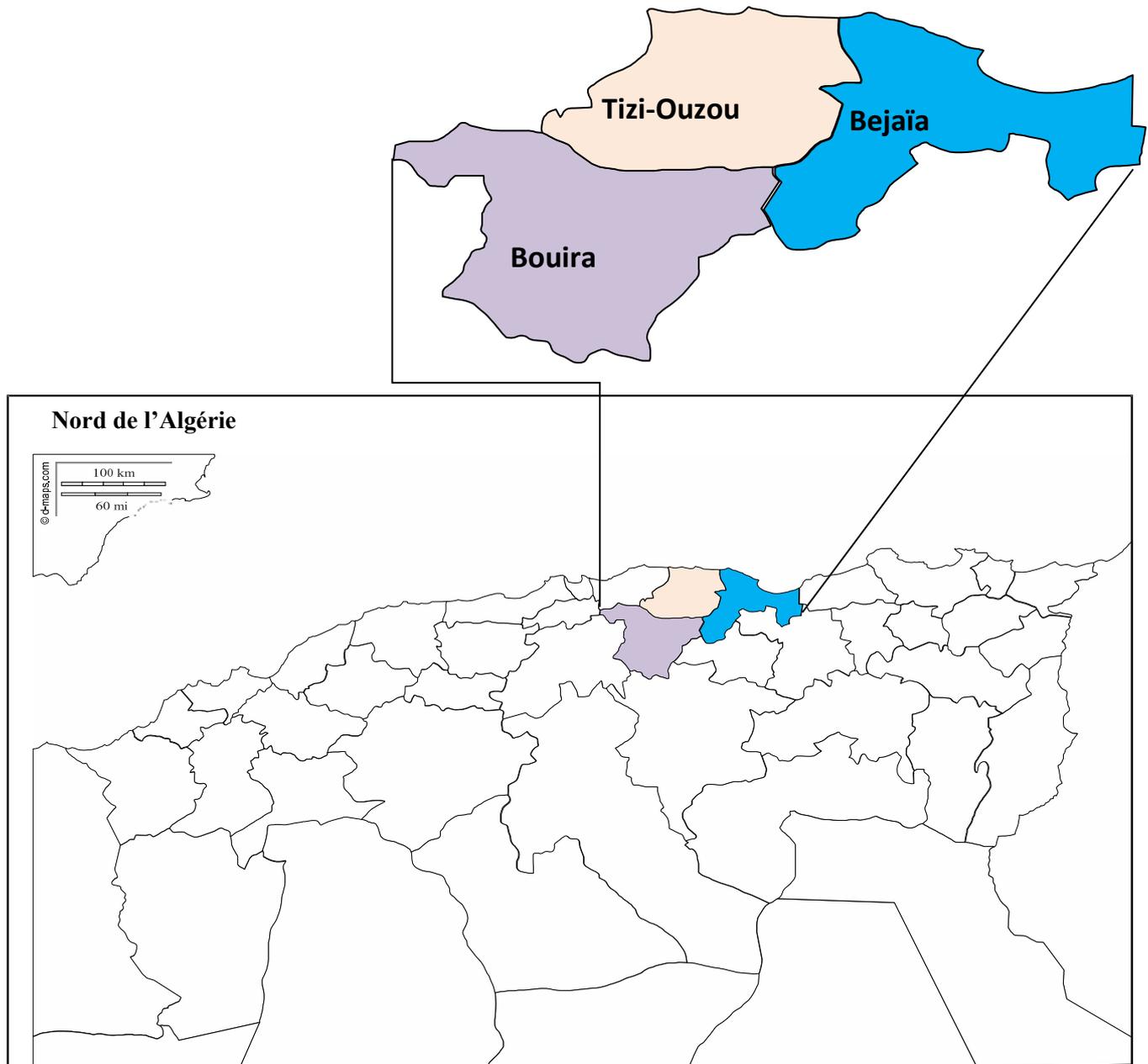
#### a-La kabylie :

L'Algérie est constituée d'une multitude de reliefs. Le nord est sillonné d'ouest en est par une double barrière montagneuse (Atlas tellien et saharien) avec des chaînes telles que le Dahra, l'Ouarsenis, le Hodna, les chaînes de Kabylie (le Djurdjura, les Babors et les Bibans) et l'Aurès.

Notre étude a été réalisée au niveau des différents abattoirs des trois wilayas Tizi-Ouzou, Bouira et Béjaia régions situées au nord de l'Algérie communément appelée La **Kabylie** qui est une région historique située dans le nord de l'Algérie et à l'est d'Alger.

Terre de montagnes densément peuplées, elle est entourée de plaines littorales à l'ouest et à l'est au nord par la Méditerranée et au sud par les Hauts Plateaux.

La Kabylie comporte plusieurs zones climatiques. Le littoral et la Kabylie maritime sont de climat méditerranéen. L'hiver y est plutôt doux comparé au reste de la région, avec une température de 15 °C en moyenne. La période estivale, rafraîchie par les vents marins, présente une température moyenne de 35°C environ. Sur les hauteurs, le climat est beaucoup plus rude, avec parfois des températures négatives et une neige abondante l'hiver et des étés très chauds, très secs, notamment vers le sud où la pluviométrie est moindre. (9)



**Figure 27** : Carte géographique de la zone d'étude (Bouira, Tizi-Ouzou, Béjaïa) (10)

**\*Wilaya de Tizi-Ouzou**

La Wilaya de Tizi-Ouzou présente un relief montagneux fortement accidenté qui s'étale sur une superficie de 2 994 km<sup>2</sup>. Elle comprend une chaîne côtière composée des Daïras de Tigzirt, Azzeffoun, un massif central situé entre l'Oued Sebaou et la dépression de Drâa El Mizan, Ouadhias. La wilaya de Tizi Ouzou est limitée par: La mer méditerranée au Nord ; La Wilaya de Bouira au Sud ; La Wilaya de Boumerdes à l'Ouest ; la Wilaya de Bejaia à l'Est (11).

## ➤ Le climat

La wilaya de Tizi-Ouzou qui est une partie d'Algérie du nord se situe donc sur la zone de contact et de lutte entre les masses d'air polaires et tropicales. D'Octobre- Novembre à Mars- Avril, les masses d'air arctique l'emportent généralement et déterminent une saison froide et humide. Les autres mois de l'année, les masses d'air tropicales remontent et créent chaleur et sécheresse. Le temps variable, fréquent sur la wilaya est créé par des fronts discontinus, dus à la circulation zonale (d'Ouest en Est) de l'air. L'humidité dans la wilaya est due à des dépressions de front polaire qui balaient les montagnes et provoquent pluie et neige. La pluviométrie moyenne se situe entre 600 et 1000 mm d'eau par an. Les précipitations peuvent varier considérablement d'une année à une autre et les neiges peuvent être abondantes sur le Djurdjura et l'extrémité orientale du massif central (11).



**Figure 28:** Carte géographique Tizi-Ouzou: 1. Ain El Hammam • 2. Azazga • 3. Azeffoun • 4. Beni Douala • 5. Beni Yenni • 6. Boghni • 7. Bouzguen • 8. Draâ Ben Khedda • 9. Draâ El Mizan • 10. Iferhounène • 11. Larbaâ Nath Irathen • 12. Mâatkas • 13. Makouda • 14. Mekla • 15. Ouacif • 16. Ouadhia • 17. Ouaguenoun • 18. Tigzirt • 19. Tizi Gheniff 20. Tizi Ouzou 21. Tizi Rached.(11)

### **\*Wilaya de Bejaïa:**

La wilaya de Béjaïa est située au nord est de l'Algérie, dans la région de la Kabylie. Elle est délimitée :

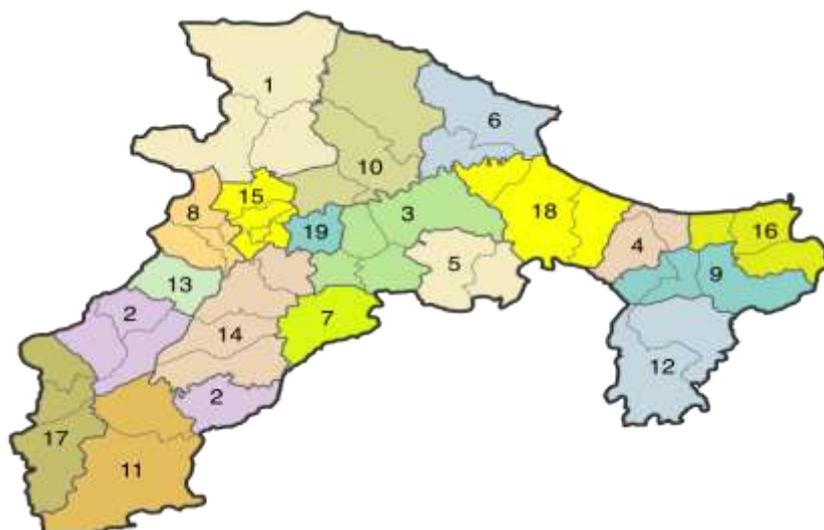
- à l'ouest par les wilayas de Tizi-Ouzou et Bouira ;
- au sud par les wilayas de Bouira et Bordj-Bou-Argeridj ;

- à l'est par les wilayas de Sétif et Jijel;
- au nord par la mer Méditerranée.

La zone côtière longue de plus de 120 km, alternant criques rocheuses et plages de sable fin d'est vers l'ouest. La côte est s'étend de l'embouchure de l'Oued Soummam à celui de l'Oued Agrioun. Cette bande côtière, retardée au niveau des villages de Tichy et d'Aokas, étroite (200 à 2 000 mètres) et principalement composée de terre sablonneuse du fait de la pression maritime proche. La côte ouest s'étend de Cap Carbon jusqu'à Cap Sigli, cette bande côtière est escarpée.(12)

### ➤ Le climat

Comme toutes les régions du littoral algérien, la wilaya de Béjaïa bénéficie d'un climat tempéré avec un hiver doux caractéristique des zones méditerranéennes avec une température de 15 °C en moyenne. La période estivale, rafraîchie par les vents marins, présente une température moyenne de 25 °C environ. Sur les hauteurs, le climat est beaucoup plus rude, avec parfois des températures négatives et une neige abondante l'hiver et des étés chauds, dans la vallée de la Soummam, couloir de passage du sirocco la pluviométrie est de l'ordre de 1 200 mm/an. Elle est parmi les régions les plus arrosées d'Algérie(12).



**Figure29** : carte de la wilaya de Béjaïa : 1. Adekar • 2. Akbou • 3. Amizour • 4. Aokas • 5. Barbacha • 6. Béjaïa • 7. Beni Maouche • 8. Chemini • 9. Darguina • 10. El Kseur • 11. Ighil Ali • 12. Kherrata • 13. Ouzellaguen • 14. Seddouk • 15. Sidi-Aïch • 16. Souk El Ténine • 17. Tazmalt • 18. Tichy • 19. Timezrit.(12)

### **\*Wilaya de Bouira :**

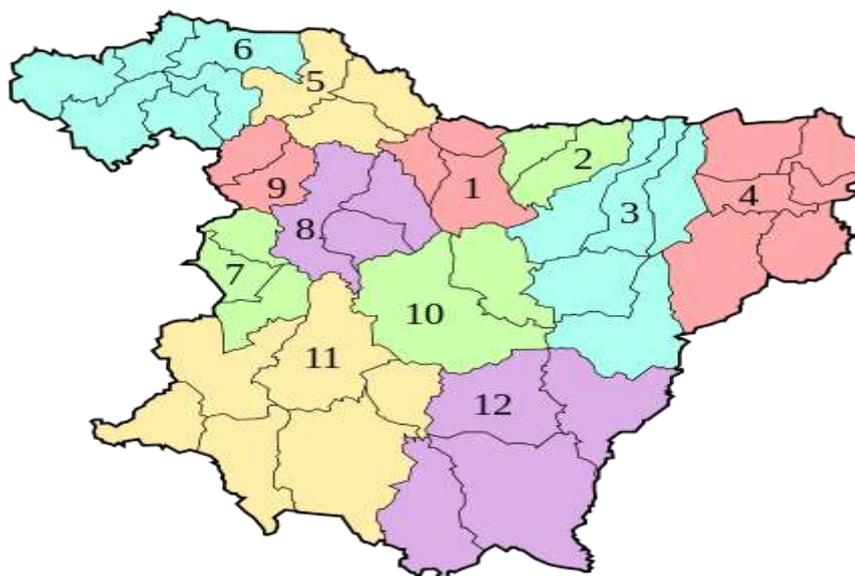
La wilaya est située est bordée par les chaînes montagneuses du Djurdjura au nord et des Bibans au sud-est. Elle est délimitée :

- au nord par les deux wilayas de Boumerdès et de Tizi Ouzou ;
- à l'est par les deux wilayas de Béjaïa et de Bordj Bou Arréridj ;
- au sud par la wilaya de M'Sila ;
- à l'ouest par la wilaya de Médéa.

#### ➤ **Le climat**

Le climat est chaud et sec en été, froid et pluvieux en hiver. La pluviométrie moyenne est de 660 mm/an au nord et de 400 mm/an dans la partie sud. Les températures varient entre 20 et 40 °C de mai à septembre et de 2 à 12 °C de janvier à mars.

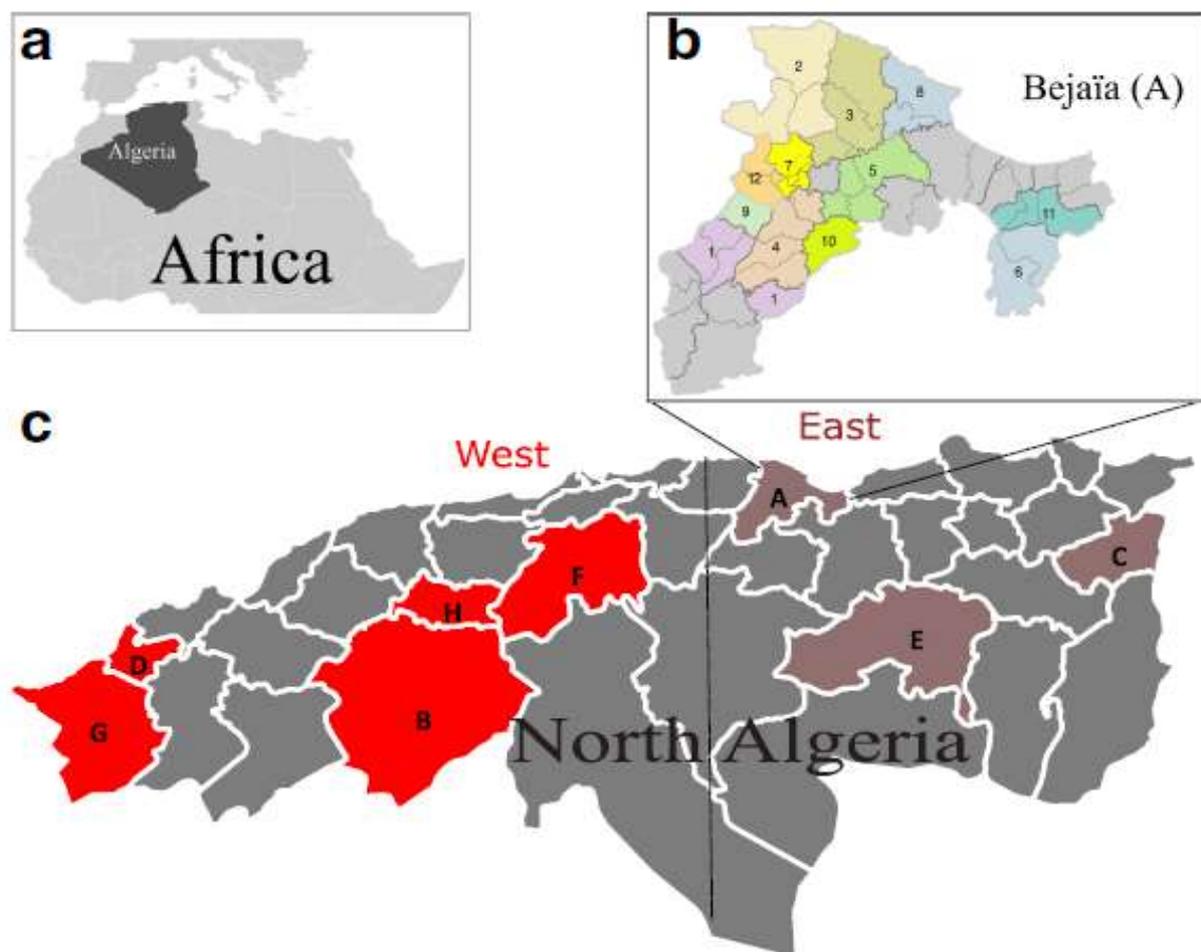
La wilaya de Bouira renferme d'importantes ressources en eau. Elle est traversée par des bassins versants importants dont l'apport moyen annuel est de l'ordre de 561 millions de m<sup>3</sup>.(13).



**Figure30** : carte de la wilaya de Bouira :1. Bouira • 2. Haizer • 3. Bechloul • 4. M'Chedallah • 5. Kadiria •6. Lakhdaria • 7. Bir Ghablou • 8. Ain Bessam • 9. Souk El Khemis •10. El Hachimia • 11. Sour El Ghozlane • 12. Bordj Okhriss (13)

**b-Zone d'étude de la partie biologique moléculaire « Nord de l'Algérie »  
(annexe 1) :**

L'étude a été réalisée dans huit wilayates du nord de l'Algérie : Bejaïa, Souk-Ahras, Batna, Médéa, Tissemsilt, Tiaret, Tlemcen et Ain-Temouchent (Figure 31). Des échantillons de la wilaya de Bejaïa ont été collectés dans 12 communes différentes (Figure 31.b). La région étudiée est caractérisée par un climat méditerranéen et est divisée par deux barrières géographiques, le Tell et l'Atlas du Sahara. Le nord de l'Algérie est caractérisé par un hiver froid et un été chaud avec des précipitations importantes. Ces conditions sont avantageuses pour la transmission de Fasciola.



**Figure 31** : Carte géographique de l'Algérie (a). Bejaïa (b). Nord de l'Algérie (c) Wilayas : Bejaïa (A), Tiaret (B), Souk-Ahras (C), Ain-Temouchent (D), Batna (E), Médéa (F), Tlemcen (G), and Tissemsilt (H). Communes : Akbou (1) Adekar (2), El Kseur (3), Seddouk (4), Amizour (5), Kherrata (6), Sidi- Aïch (7), Béjaïa (8), Ouzellaguen (9), Beni Maouche (10), Darguina (11), et Chemini (12) .(14)

## **I.2. Le choix des animaux prélevés :**

Un total de 4700 bovins a été prélevé de manière aléatoire au niveau des abattoirs des trois wilayates de janvier à décembre 2017 pour les wilayas de Tizi-Ouzou et Bouira et durant deux années (2017 et 2018) pour la wilaya de Béjaia. Représentant plus de 10% du nombre total d'animaux abattus dans ces abattoirs. Sur ces animaux, des prélèvements de bile, de selles et de sang ont été effectués associés à une inspection du foie pour la recherche de lésions de cholangites distomiennes avec prélèvements du parasite.

### **\*Les abattoirs concernés sont**

**Tizi-Ouzou** comprenant Boghni, Mekla, Azazga, Tizirt, DE.Mizan, Tamda, Tala Athman, Draa Ben Khedda ; **Bouira** comprenant Zone d'Activité D1 commune de Bouira, Ain Bessam et **Béjaia** comprenant Tuerie Héritier Iberraken d'Ouzellaguen, abattoir Isekounene Lounis d'AKBOU.

### **I.2.1. Identification des animaux**

Une fiche d'enquête a été établie pour chaque prélèvement de bovin effectué. Nous y avons mentionné essentiellement : le numéro du prélèvement, l'origine de l'animal, la race, l'âge, le sexe, le type d'élevage, état général, production, administration d'anthelminthique et enfin l'état du foie à l'inspection. Voir (**Annexe 2**).

### **I.2.2. Outils statistiques**

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel SYSTAT 12 VERSION 12.00.08, Monte Carlo Version 1.00.08 et IBM SPSS Statistics 22.0 software. **Tests utilisés** : Pearson Chi-deux. Le test exact de Fisher a été utilisé lorsque les conditions d'application du test de Chi<sup>2</sup> de Pearson n'étaient pas satisfaites, on considère la présence d'une association significative entre les différentes variables lorsque la valeur de *P* est < 0.05.

### **I.2.3. Prélèvements**

#### **I.2.3.1. Prélèvement de selles :**

Après éviscération de la carcasse, 150g de matières fécales sont récoltées du rectum et déposées dans une boîte, puis conservées dans un réfrigérateur à +4°C jusqu'à leur analyse dans les 24h (Figure 32).



**Figure 32 :** (A) Prélèvements de matières fécales à partir du rectum, (B) et dépôt dans des boîtes en plastiques, (photo Chougar L., 2017).

### **I.2.3.2.Prélèvement de la bile :**

La bile est récoltée par ponction de la vésicule biliaire à l'aide d'une seringue de 5 Cc, puis conservée au réfrigérateur à +4°C jusqu'à leur analyse (Figure 33).



**Figure 33 :** prélèvement de la bile par ponction de la vésicule biliaire. (photo Chougar L., 2017).

### **I.2.3.3.Prélèvement sanguin :**

La prise de sang a été réalisée à partir de la veine jugulaire au moment de la saignée toute en prenant soin de récolter les derniers jets de sang pour éviter toute hémolyse ; 04 millilitres (ml) de sang ont été recueillis dans un tube sec (Figure 34) puis centrifugés au laboratoire à 4000 tours/min pendant 10min. Le sérum a été récolté grâce à une micropipette dans des microtubes stériles puis conservés à -20°C jusqu'à analyse.



**Figure 34** : Centrifugation du sang récolté dans des tubes secs et conservation des sérums au congélateur dans des tubes Eppendorfs. (photo Chougar L., 2017).

#### **I.2.3.4.Prélèvements des parasites :**

Après inspection des foies par la réalisation des incisions obligatoires, , les parasites ont été retirés à partir de tous les foies présentant des cholangites distomiennes puis lavés au PBS et conservés dans des tubes numérotés contenant de l'alcool 70% placés au congélateur à - 20°C (Figure 35).une partie des *D.dendriticum* a été conservée dans du formol à 10%, pour l'analyse histologique.



**Figure 35:** prélèvement du parasite et lavage au PBS (photo Chougar L., 2017).

### **I.3.Méthodes de Diagnostique :**

#### **I.3.1.Inspection des foies à l'abattoir :**

L'inspection des foies a lieu après éviscération totale et fente de la carcasse. Elle est effectuée par la réalisation de deux incisions obligatoires. La première est large et superficielle située au niveau des gros canaux biliaires à la base de la palette et la seconde est courte et profonde perpendiculaire à la première et située au niveau du lobe de SPIGEL (Figure36).



**Figure 36** : Inspection des foies par la réalisation des incisions obligatoires (photo Chougar L., 2017).

### **I.3.1. Analyse des matières fécales (analyses coprologique)**

#### **a) La technique de sédimentation (méthode de Dinnik et Dinnik (1963))**

Dans un bécher, 150 g de fèces sont triturées, puis mises en suspension dans de l'eau.

La suspension obtenue est passée au travers d'un tamis pour éliminer les gros déchets.

On laisse décanter pendant 30 min pour que les œufs puissent sédimenter.

Le surnageant est jeté, et le culot est dilué avec de l'eau puis on laisse décanter pendant 30 min.

On répète l'opération 3 à 4 fois jusqu'à ce que le surnageant devienne clair.

Enfin, à l'aide d'une pipette pasteur, on prélève quelques gouttes du culot, que l'on dépose entre lame et lamelle.

La préparation est examinée au microscope optique aux grossissements x40, x 100, x 200, et x 400 pour la recherche d'œufs de *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum*.

#### **b) Technique combinant sédimentation et flottaison (Teuscher (1965) modifiée avec Vercruyse, Cotteleer et Fameree(1971))**

Opérer une double sédimentation ; puis une centrifugation dans une solution saturé de chlorure de zinc et chlorure de sodium ( $d=1.5$ ). Recueillir les œufs d'helminthes sur une lamelle qui est posée sur le ménisque supérieur de la suspension, et les œufs plus légers que la suspension viennent flotter et s'y accoler.

Après 10 min, enlever la lamelle, la poser sur une lame porte-objet,

Examiner cette préparation au microscope optique aux grossissements x 40, x 100 , x 200 et x 400 pour la recherche d'œufs de *Dicrocoelium dendriticum* et *Fasciola hepatica*.

### **I.3.3. Analyse de la bile**

La bile contenue dans les seringues est transvasée dans des tubes coniques.

Ces derniers sont centrifugés à 5000 tours/min pendant 10 min.

Quelques gouttes du culot obtenu sont aspirées à l'aide d'une pipette pasteur et déposées sur une lame et recouvertes d'une lamelle.

Le tout est observé au microscope optique aux grossissements x 40, x 100, x 200 et x 400 pour recherche des œufs de *Dicrocoelium dendriticum* et *Fasciola hepatica*.

### **I.3.4. Analyses histologiques des parasites (*D. dendriticum*)**

L'analyse histologique des parasites a été effectuée suivant la technique suivante :

**1-Fixation :** la fixation histologique a pour but d'immobiliser les structures, de les conserver en s'opposant à l'autolyse cadaverique. la fixation utilisé est le formol à 10% en immergeant l'adulte de *Dicrocoelium dendriticum* dans le liquide de fixation (10 fois son volume).

**2-La macroscopie :** apprécier la taille l'aspect externe la consistance et la coloration

Au terme de cet examen, les douves sont incluses dans des unicassettes en plastique numérotées.

**3-Circulation :** le bute de la technique est d'obtenir des coupes histologiques de 3 à 5 µm. pour cela le tissu doit être imprégné dans un milieu rigide. Le milieu d'inclusion est la paraffine qui n'est pas miscible à l'eau : le tissu doit donc passer dans des liquides intermédiaires miscibles à l'eau et au milieu d'inclusion. Cette étape est décrite sous le terme de circulation ; elle se fait dans un appareil appelé autotechnicon. Le panier contenant les prélèvements sont transférés d'un bain à un autre de façon automatique.

La première étape est la déshydratation : l'éthanol (alcool) est le plus utilisé des agents déshydratant .il est utilisé dans des bains de concentration croissante (de 70% à 100%) ce passage se fait en 12 heures.

La seconde étape est l'éclaircissement celui-ci consiste à remplacer l'éthanol par un solvant. Au terme de cette étape le tissu devient transparent d'où le terme

d'éclaircissement .les agents éclaircissants sont le benzène le toluène le xylène (4bains)  
cette étape dure 8heures.

La dernière étape de la circulation est l'imprégnation plusieurs bains de paraffine sont utilisés (60°) cette étape dure 4 heures (Figure 37).

**\*Inclusion en paraffine ou enrobage ;** la paraffine fondue est versée dans un moule, le prélèvement est déposé, la cassette comportant le numéro est ajustée au dos du moule. Le moule est ensuite mis à refroidir sur une plaque métallique réfrigérée. Les blocs sont démoulés après refroidissement de la paraffine (Figure 38).

**\*Microtome :** L'appareil qui permet d'obtenir des rubans de fines couche des tissus

**\*Installation du bloc :** Le bloc est introduit dans la pince à objet du microtome et immobilisé grâce à la vis de blocage. Sa surface doit être verticale.

**Rabotage :** Cette étape consiste à enlever la couche de paraffine en excès (coupe de 15 à 20 µm)

**Confection de rubans :** Les coupes effectuées adhèrent les unes aux autres en formant un ruban de 3 à 5 µm d'épaisseur.

**Étalement :** le tissu inclus dans la paraffine est comprimé pendant la coupe : Le recours à un bain d'eau chaude pour ramollir la paraffine permettra à la coupe de se décompresser. L'étalement des coupes se fait dans un bain thermostaté (40°) (on recueille les coupes à l'aide d'une lame) (Figure 39).

**Coloration :** La coloration est précédée par le déparaffinage et l'hydratation. Le déparaffinage est assuré par le xylène (3bains pendant 3à5minutes).l'hydratation a pour but de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par de l'eau : Trois bain d'éthanol à concentration décroissante sont utilisés. La coloration utilisée est la méthode à **l'hématéine-éosine** (Figure 40).

-plonger la lame dans 3bains d'alcool de concentration différentes pendant 3min

-rincer à l'eau 2min

- Colorer à l'hématéine de Harris pendant 15 secondes

- Passage à l'eau ammoniacale durant 1min

- Rincer à l'eau pendant 2min

- Colorer à l'éosine pendant 15secondes
- Rincer à l'eau durant 5min
- Déshydrater en rinçant dans l'éthanol absolu

**Montage :**

- Eclaircir dans un bain de xylène
- Fixer à l'aide d'une masse collante(Eukitt) la lamelle de verre sur la lame.

	
<p><b>Figure 37 :</b> Réalisation de l'étape de circulation dans l'Autotechnicon. (photo Chougar L., 2018).</p>	<p><b>Figure 38 :</b> Inclusion en paraffine ou enrobage (photo Chougar L., 2018).</p>
	
<p><b>Figure 39 :</b> Etalement des coupes dans un bain thermostaté (40°C) (photo Chougar L., 2018).</p>	<p><b>Figure 40 :</b> Coloration des lames par la méthode hématoxyne-éosine(photo Chougar L., 2018).</p>

**I.3.5. Analyses sérologiques :**

**I.3.5.1. Principe du test :**

Des microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique d'une protéine de *Fasciola hepatica*. L'anticorps assure la capture et la purification de cette protéine à partir d'un lysat du parasite. Les colonnes impaires (colonnes 1, 3, 5, 7, 9,

11) des microplaques contiennent la protéine parasitaire purifiée capturée par l'anticorps monoclonal tandis que les colonnes paires (colonnes 2, 4, 6, 8, 10, 12) ne contiennent que l'anticorps monoclonal. L'utilisation d'un tel témoin négatif permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les sérums sanguins, sont dilués dans le tampon de dilution. Après incubation et lavage de la préparation, le conjugué, un anticorps monoclonal spécifique des IgG1 bovines couplé à la peroxydase, est ajouté. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à 21°C +/- 3°C et d'un second lavage, on ajoute la solution de révélation (TMB monocomposant). En cas de présence d'immunoglobulines spécifiques de *Fasciola hepatica* dans le sérum, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant le parasite et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en anticorps spécifiques présents dans l'échantillon. Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée par le témoin antigénique est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par le trématode (Figure 41).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T+	T+										
B	T-	T-										
C	TR	TR										
D	EC1	EC1										
E	EC2	EC2										
F												
G												
H												

**Figure 41** : Disposition des différents échantillons de sérums sur les plaques ELISA (T+ : Témoin positif, T- : Témoin négatif, TR : Traceur, EC1 : échantillon 1 , EC2 : échantillon 2).

### I.3.5.2. Composition de la trousse

**Tableau VII:** Différents constituants du kit ELISA

	BIO K 211/2	BIO K 211/5
Microplaques	2	5
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)	1 X 250 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)	1 X 100 ml (5 X)
Conjugué	1 X 0,5 ml (50 X)	1 X 1,4 ml (50 X)
Sérum positif	1 X 0,5 ml (1 X)	1 X 0,5 ml (1 X)
Sérum négatif	1 X 0,5 ml (1 X)	1 X 0,5 ml (1 X)
Traceur	1 X 0,5 ml (1 X)	1 X 0,5 ml (1 X)
Solution TMB monocomposant	1 X 25 ml (1 X)	1 X 55 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 X 15 ml (1 X)	1 X 30 ml (1 X)

### I.3.5.3. Mode opératoire :

**1-** Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation. Retirer la microplaque de son emballage (Figure 42)

#### **2- Préparation et dilution des échantillons**

##### **2.1- Préparation des sérums sanguins**

Les sérums sanguins doivent être dilués au 1/100. Tout en évitant d'utiliser des échantillons hémolysés ou renfermant des coagula. (Figure 44).

##### **2.1.1- Dilution en tube :**

Distribuer 990 µl de tampon de dilution, préparé suivant les modalités décrites selon le kit, dans des tubes de 5 ou de 10 ml. Ajouter dans chacun de ces tubes 10 µl des échantillons et agiter brièvement sur un agitateur mécanique (dilution finale au 1/100).

##### **\*Préparation du tampon de dilution :**

Pour une plaque de 96 puits –mélanger 20 ml du tampon de dilution avec 80 ml d'eau distillé.

##### **2.2- Dilution des sérums de référence de la trousse (positive et négative) et du traceur :**

Les sérums positifs et négatifs ainsi que le traceur doivent être dilués au 1/100. Réaliser cette dilution en une étape en tube (Figure 45).

**3-** Distribuer les échantillons (sérums sanguins) à raison de 100 µl par puits.

La disposition suivante a été appliquée : sérum positif : puits A1 et A2, sérum négatif : puits B1 et B2, traceur : puits C1 et C2, échantillon 1 puits D1 et D2 etc....

- Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant une heure. (Figure 46).

**4-** Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée selon les modalités définies du kit.

**\*Préparation de la solution de lavage :**

Pour 5 plaques : mélanger 250ml de la solution de lavage avec 4750ml d'eau distillé (Figure 47).

- Egoutter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. Ajouter 300 µl de la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus du récipient de confinement. Répéter quatre fois l'opération en évitant tout particulièrement la formation de bulles dans les cupules. Durant notre travail l'utilisation d'un laveur de plaques automatique a été réalisée. Il est cependant nécessaire de régler la profondeur d'immersion des aiguilles de manière à ne pas altérer la couche de réactifs adsorbés sur le fond des puits.

**5-** Dilution au 1/50 du conjugué dans le tampon de dilution

\*pour une plaque, diluer 250 µl de la solution mère du conjugué dans 12,25 ml de solution de dilution. Distribuer 100 µl par puits de la solution diluée de conjugué (Figure 48). Couvrir et incuber 1 heure à 21°C +/- 3°C.

**6-** Laver la plaque comme décrit au point 4.

**7-** Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits.(Figure 49).

La solution de révélateur doit être parfaitement incolore lors de la distribution sur la plaque. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution ou de la pipette.

**8-** Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C. à l'obscurité et sans couvrir (Figure 49).

Ce temps n'est donné qu'à titre indicatif car dans certaines circonstances, il pourra être utile de l'allonger ou de le raccourcir.

9- Distribuer la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe de bleu à jaune (Figure 50).

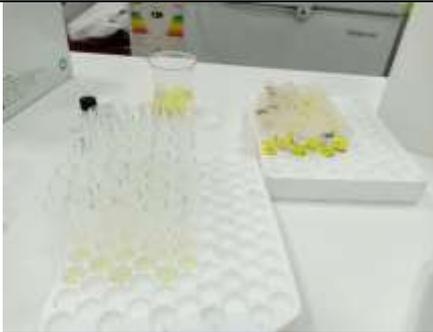
10-Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm. Les résultats doivent être enregistrés le plus rapidement possible après l'application de la solution d'arrêt. En effet, en cas de signal élevé, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées (Figure 51).



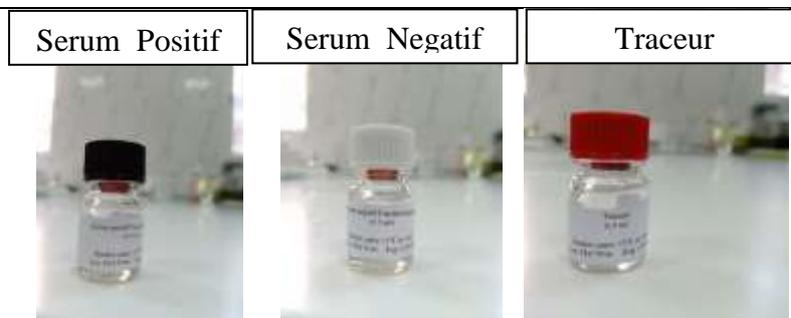
**Figure42** : Photo des constituants du kit ELISA



**Figure43** : plaque ELISA *Fasciola hepatica*



**Figure44** : Dilution des sérums sanguins au 1/100 dans le tampon de dilution



**Figure 45**: Les sérums positifs et négatifs ainsi que le traceur (photos Chougar L., 2018).



**Figure46** : Plaque couverte de film adhésif et laisser incuber pendant 1heure (photos Chougar L., 2018).



**Figure47** :(A) Laveur Automatique (Bio-RAD) (photos Chougar L., 2018).



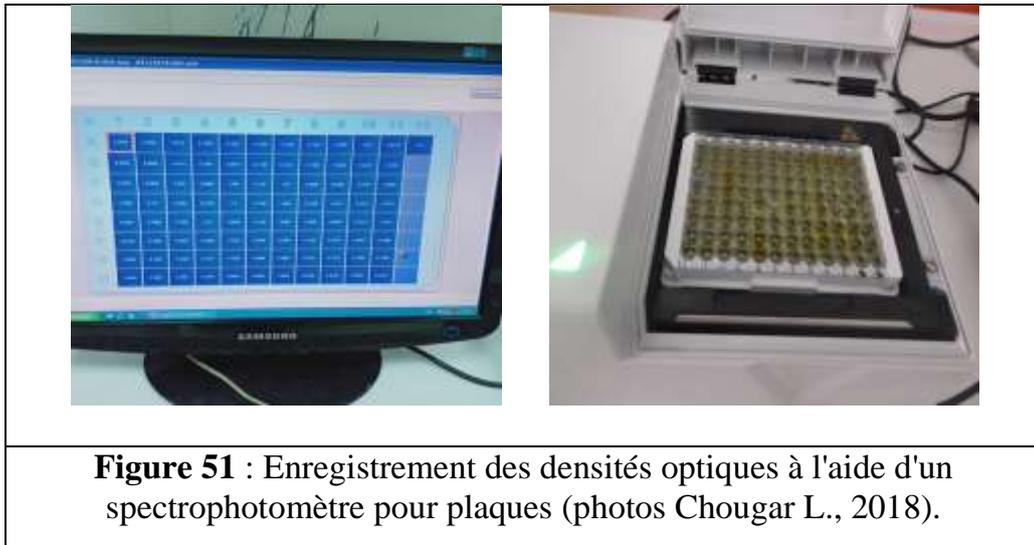
**Figure 48** : Diluer au 1/50 le conjugué dans le tampon de dilution (photos Chougar L., 2018).



**Figure 49**: Distribution du révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits et incubation 10 minutes à 21°C +/- 3°C à l'obscurité et sans couvrir (photos Chougar L., 2018).



**Figure 50**: Distribution de la solution d'arrêt à raison de 50 µl par puits. La couleur passe du bleu au jaune. (photos Chougar L., 2018).



**Figure 51** : Enregistrement des densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques (photos Chougar L., 2018).

#### I.3.5.4. Interprétation des résultats

- Soustraire de chaque valeur enregistrée sur les colonnes impaires le signal des puits témoins négatifs correspondants et noter le résultat obtenu (calcul des deltas D.O.). Pour effectuer ce calcul, tenir compte de l'existence éventuelle de valeurs négatives. Procéder de même pour les sérums positifs et négatifs.
- Le test ne peut être validé que si le sérum positif fournit une différence de densité optique en dix minutes supérieure à **0,800** et le sérum négatif fournit une différence de densité optique inférieure à **0,300**.
- Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue avec le sérum positif et multiplier ce résultat par 100 pour l'exprimer sous la forme d'un pourcentage.

$$\text{Val(eur)} = \frac{\text{Delta DO éch} * 100}{\text{Delta DO pos}}$$

En utilisant le **Tableau VIII** repris ci-dessous, on détermine le niveau de positivité des sérums.

**Tableau VIII:** Tableau déterminant les différents niveaux de positivité des sérums

	0	+/-	+	++	+++
Echantillon individuel	Val <10%<=	Val <15%<=	Val <45%<=	Val <75%<=	Val
Pool de 10 échantillons	Val <5%<=	Val <15%<=	Val <45%<=	Val <75%<=	Val

\* L'interprétation des niveaux de positivité est la suivante :

**0:** Pas d'infestation par *Fasciola hepatica*

**+/-:** Résultat douteux. Refaire le test un mois plus tard

**+:** Infestation faible

**++:** Infestation moyenne

**+++:** Forte infestation

### **I.3.6. Analyses moléculaires de *Fasciola* spp.**

#### **a. Échantillonnage de *Fasciola* et analyses morphométriques**

Après l'examen post mortem de **1701** bovins, des douves adultes ont été prélevées sur **87** foies infectés de janvier à décembre 2017. Les échantillons ont été recueillis dans des pots en plastique, puis lavés dans du PBS.

La longueur du corps (BL) et la largeur du corps (BW) ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse (figure 52). Le rapport longueur / largeur du corps (BL / BW) a également été calculé pour chaque échantillon. Une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA), mise en œuvre dans SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL), a été réalisée afin de déterminer s'il existait une variation morphométrique significative entre des douves isolées provenant de différentes localités.

Les localités ont été divisées en deux groupes, Est (Bejaïa, Souk-Ahras et Batna) et Ouest (Médéa, Tissemsilt, Tiaret, Tlemcen et Ain-Temouchent) (Figure 31)



**Figure 52 :** Mesures morphométriques des douves récoltées au niveau des différentes localités à l'aide d'un pied à coulisse (photo Chougar L., 2017).

### **b. Préparation, fixation des parasites**

Après récolte des douves à partir des foies infestés au niveau des différents abattoirs dans des boîtes en plastique ; on procède au lavage des douves au PBS (Figure 34) pour l'élimination de tout les débris biliaires et sanguins. Vient en suite la fixation des spécimens, destinés à l'étude moléculaire dans de l'éthanol à 70% (spécial PCR) puis conservés au congélateur à -20°C. Cette méthode a été préférée à celle de la congélation car le transport des échantillons est facilité.

### **c. Choix de la portion du gène et conditions du choix : (ITS-1/5,8S/ITS-2, COI; NAD1, COI-trnT-rrnL)**

Les conditions minimales que doit remplir une molécule pour pouvoir satisfaire les objectifs de la biologie comparative et de la reconstruction phylogénétique ont été définies (Lecointre, 1993 ; Lecointre *et al.*, 1993) et sont de manière générale:

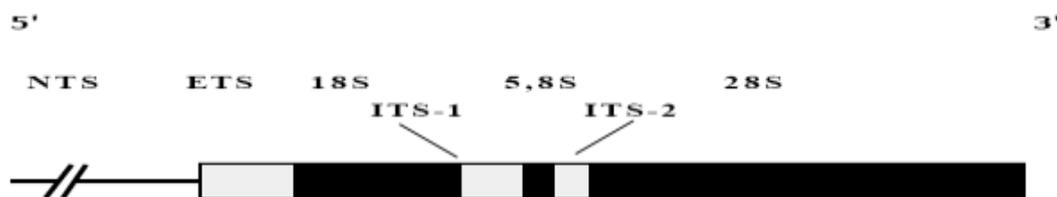
- **L'ubiquité:** elle doit être présente chez tous les organismes étudiés.
- **L'orthologie:** elle doit être qualifiée d'orthologue, c'est-à-dire la similitude observée doit être due à une descendance commune (Fitch, 1970).
- **La conservation:** elle doit posséder des régions comparables dont les taux d'évolution ne doivent pas trop différer pour permettre la recherche de sites homologues.

### **1. Séquences nucléaires : Choix et obtention**

#### **\* L'ADN ribosomal nucléaire : Généralités**

Les ADNr nucléaires codent pour les gènes des ARNr constitutifs impliqués entre autres dans le bon positionnement des ARNm pour leur traduction en protéines (Lewin, 1994).

Les ADNr sont organisés en domaines d'unités invariables répétées en tandem. Chaque unité de répétition, d'une longueur environ 10000 paires de bases (10 Kb), est composée d'une région non codante (NTS et ETS) et d'une région codante, appelée cistron. Chaque cistron est constitué de trois exons, les plus grands gènes d'ADNr (18S, 5,8S, 28S) qui codent, lors de la transcription en ARN messenger, pour les trois sous-unités protéiques qui composent le ribosome. Les trois gènes sont séparés par deux espaceurs internes transcrits (ITS) (Figure 53). Chaque unité est séparée d'une autre unité par un espaceur intergénique non transcrit IGS ou IGR, formellement appelé espaceur non transcrit (NTS) (Bruns *et al.*, 1991; Henson et French, 1993) ( Figure 53).



**Figure 53:** Unité de transcription d'ADNr d'eucaryote avec son espaceur non transcrit. NTS: Non Transcribed Spacer, espaceur non transcrit; ETS: External transcribed spacer, espaceur externe transcrit; ITS: Internal transcribed spacer, espaceur interne transcrit, 18S, 5,8S et 28S correspondent aux gènes codant pour les sous-unités ribosomiques correspondantes (Hillis et Dixon, 1991).

#### \* Choix de la portion de gènes et amorces pour amplification

La détermination de la portion du gène qui devait être utilisée pour atteindre les buts fixés de la présente étude a été effectuée après alignement des séquences disponibles dans la banque de nucléotides (GenBank). Les séquences spécifiques du genre *Fasciola* pour l'ADNr (18S /ITS 1/5,8S/ITS-2) ont été extraites. Ainsi les espaceurs internes transcrit ITS-1 et ITS-2, avec, la région codante d'ADNr 18S et 5,8S, ont été choisis. Nous avons utilisé les amorces BD1 (sens) et BD2 (anti-sens) (Tableau X).

## 2. Séquences mitochondriales (COI; NAD1, COI-trnT-rrnL): Choix et obtention

Le mode d'hérédité maternelle de l'ADNmt (Wolstenholme, 1992) est une caractéristique qui en fait d'elle actuellement un des marqueurs moléculaires les plus utilisés pour explorer la diversité des populations et établir les relations phylogénétiques inter et intra-



### **\* Choix de la portion de gènes et amorces pour amplification**

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux gènes codant pour la région COI-trnT-rrnL (Le et al. 2012), pour NADI. (Itagaki et al. 2005), et enfin pour COI (Bowles et al. 1992).

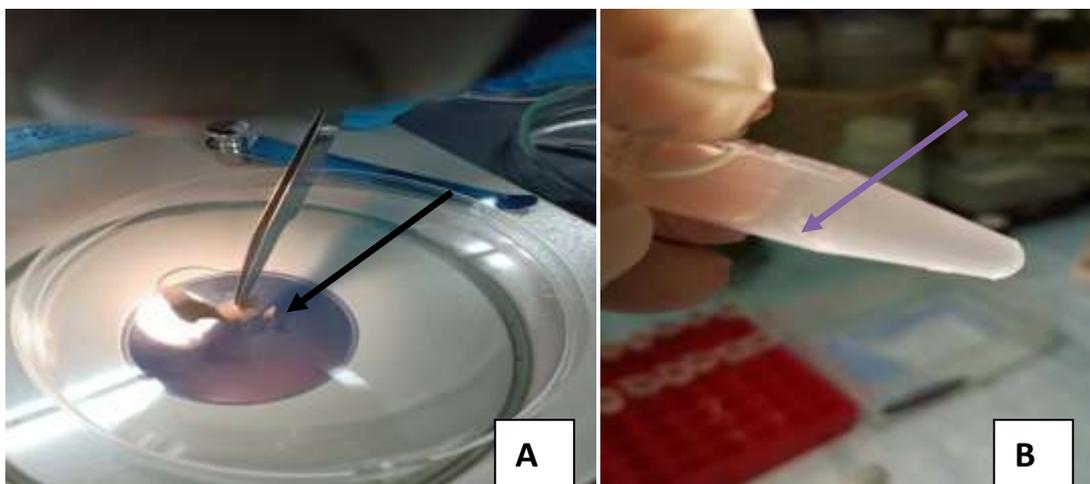
L'analyse moléculaire a été réalisée au niveau du laboratoire KSU Mammals Research Chair, Department of Zoology, College of Science, King Saud University.

### **3. Extraction, amplification, Évaluation de la quantité et de la qualité de l'ADN et enfin séquençage de l'ADN**

Un à trois douves adultes ont été sélectionnées au hasard parmi chaque hôte pour une analyse moléculaire, pour un total de 140 échantillons. Les échantillons ont été stockés dans de l'éthanol à 70% et conservés à - 20 ° C.

#### **\*Extraction**

L'ADN génomique a été extrait d'une partie de la zone latérale de la douve adulte à l'aide du kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, États-Unis) conformément aux recommandations du fabricant (Annexe 3) (Figure 55).



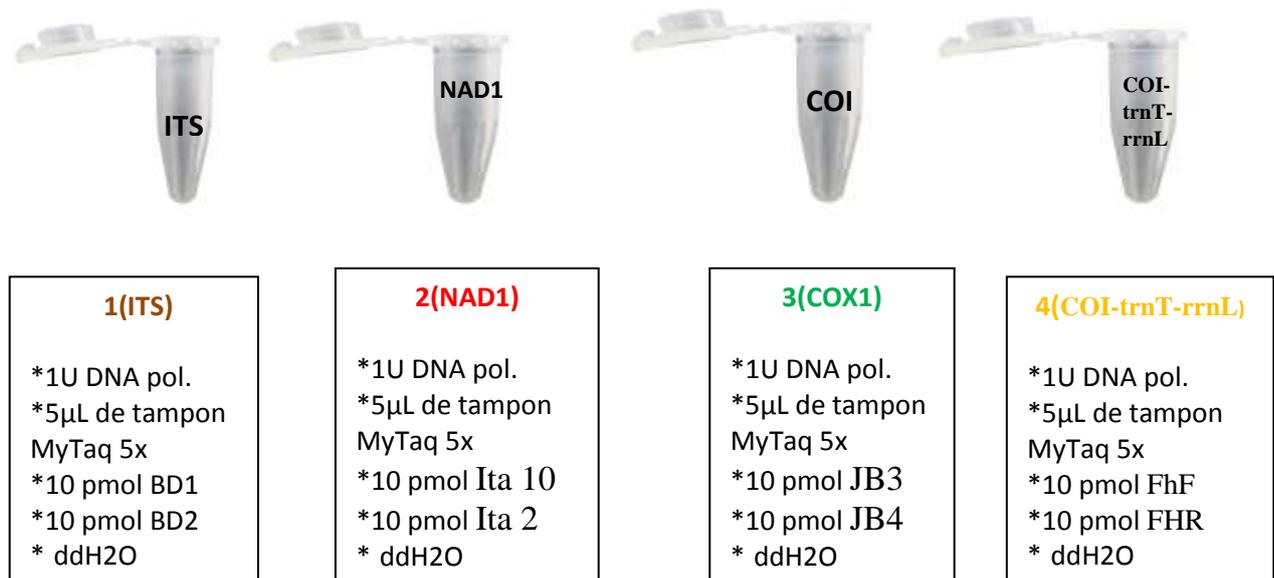
**Figure 55:**A/ coupe de la partie de la zone latérale de la douve adulte .B/Filament d'un brin d'ADN après extraction (photos Chougar L., 2018).

#### **\*Amplification (PCR de base) :**

Pour l'amplification, 1  $\mu$ L d'ADN génomique a été ajouté dans un mélange réactionnel de 25 $\mu$ L contenant 1U d'ADN polymérase MyTaq (Bioline, Memphis, USA), 5 $\mu$ L de tampon MyTaq 5  $\times$  ; 10 pmol de chaque amorce et ddH<sub>2</sub>O (sterile ultra-pure water).

-Les amorces BD1 et BD2 ont été utilisées pour l'amplification de la région ITS, incluant les 18S rDNA, ITS-1, 5.8 rDNA et ITS-2.

-FhF et FHR pour COI-trnT-rrnL (Le et al. 2012)



**Figure 56 :** Schéma représentatifs des différents mixtes utilisés pour l'amplification des (ITS, NAD1, COI et COI-trnT-rrnL).

-Ita 10 et Ita 2 pour NADI. (Itagaki et al. 2005),

-JB3 et JB4 pour COI (Bowles et al. 1992). (Tableau IX et X)

**Tableau IX :** Amorces utilisées pour l'amplification de COI-trnT-rrnL (Le et al., 2012),

Amorces	Spécifique de	Sequence (5'-3')	Longueur (bp)
<b>FHF</b>	<i>F. hepatica</i>	GTTTTTTAGTTGTTTGGGGTTTG	23
<b>FHGR</b>	Both species	ATAAGAACCGACCTGGCTCAC	21

\*/ L'amplicon produit par la paire d'amorce FHF / FHGR est de 1 031 bp

**Tableau X:** Différentes amorces utilisées pour l'amplification de COI, NADI, ITS-1-2

<b>COI</b>	<b>JB3</b>	<b>TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT</b>
	<b>JB4</b>	<b>TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG</b>
<b>ITS-1 – 2</b>	<b>BD1</b>	<b>GTCGTAACAAGGTTTCCGTA</b>
	<b>BD2</b>	<b>TATGCTTAAATTCAGCGGGT</b>
<b>NADI</b>	<b>Ita 10</b>	<b>AAGGATGTTGCTTTGTCGTGG</b>
	<b>Ita 2</b>	<b>GGAGTACGGTTACATTCACA</b>

-Mettre 24  $\mu$ l de chaque mixte dans un tube eppendorf spéciale PCR

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	N..	C	ITS
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	N..	C	NAD1
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	N..	C	COI
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	N..	C	COI-trnt-rrnl

-Rajouter 1  $\mu$ l d'ADN de chaque échantillon dans les quatre mixtes de (ITS ,NAD1,COI,COI-trnt-rrnl)

-Mettre dans le Thermocycleur (Figure 57).



**Figure 57** : Mise pour amplification des différents mixtes dans le thermocycleur.

Les cycles de réaction ont consisté en une dénaturation initiale à 94 ° C pendant 4 min, suivie de 30 cycles à 94 ° C pendant 90 secondes, à 55 ° C (pour le COI) ou à 53 ° C (pour le NADI), à 52 ° C (COI). -trnT-rrnL) ou 62 ° C (pour ITS) pendant 90 s et 72 ° C pendant 120 s avec une extension finale à 72 ° C pendant 10 min. Au cours des amplifications, un contrôle négatif a été inclus pour évaluer une éventuelle contamination.

**Contrôle négatif** : mixture de PCR (1U d'ADN polymérase MyTaq (Bioline, Memphis, USA), 5 $\mu$ L de tampon MyTaq 5  $\times$  ; 10 pmol de chaque amorce et ddH<sub>2</sub>O (sterile ultra-pure water) ,sans ADN.

**Tableau XI:** cycles de réaction utilisés pour l'amplification de COI, NADI, ITS et COI-trnT-rrnL

Marqueurs moléculaires	Etape	Durée	température	Nombre de cycle (s)
<b>COI</b>	Pré-dénaturation	4 min	94 °C	X1
	Dénaturation	90s	94 °C	X30
	Hybridation	90 s	55 °C	X30
	Elongation	120s	72 °C	X30
	Elongation finale	10min	72 °C	X1
<b>NADI</b>	Pré-dénaturation	4 Min	94 °C	X1
	Dénaturation	90s	94 °C	X30
	Hybridation	90 s	53 °C	X30
	Elongation	120s	72 °C	X30
	Elongation finale	10min	72 °C	X1
<b>COI-trnT-rrnL</b>	Pré-dénaturation	4 min	94 °C	X1
	Dénaturation	90s	94 °C	X30
	Hybridation	90 s	52 °C	X30
	Elongation	120s	72 °C	X30
	Elongation finale	10min	72 °C	X1
<b>ITS</b>	Pré-dénaturation	4 min	94 °C	X1
	Dénaturation	90s	94 °C	X30
	Hybridation	90 s	62 °C	X30
	Elongation	120s	72 °C	X30
	Elongation finale	10min	72 °C	X1

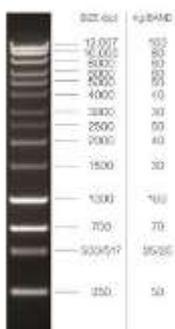
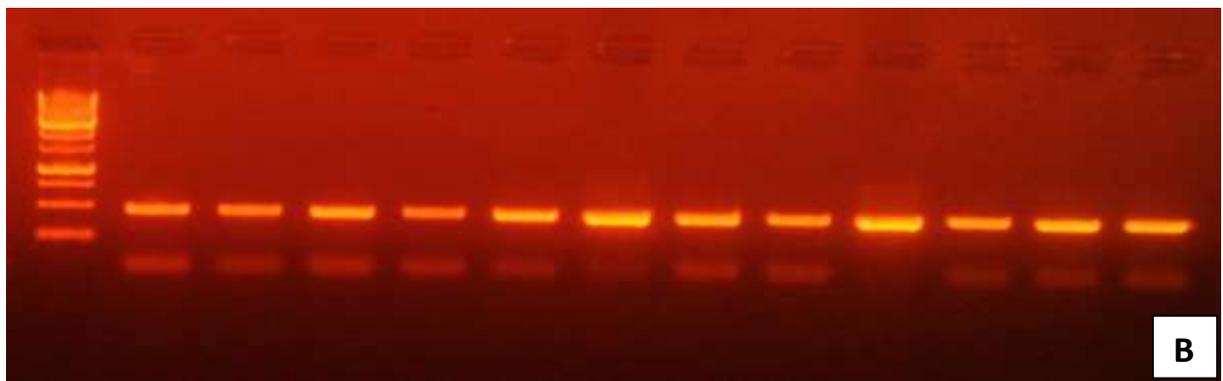
**\*Migration en gel d'Agarose (1%) (Pour évaluer la qualité de l'ADN) :**

La qualité de l'ADN génomique a été évaluée par électrophorèse en gel, 6 µl d'ADN et 2.5 µl de la solution de dépôt (50% glycérol, 1 % SDS, 0,1M EDTA, 0,05% de Bleu de Bromophénol) ont été déposés dans chaque puits sur un gel d'agarose 1% dans du tampon

TBE (Tris Borate, EDTA) 10X, contenant 4 $\mu$ l de BET(. Laissez migré pendant 1h à 60v 400 mA, l'ADN est chargé négativement (il migre du - vers le +).(Figure 58 A)

Les photographies ont été numérisées et analysées au moyen du programme MULTIANALYST (v.1.1, Bio-Rad). (Figure 58 B).

Un ADN de qualité se caractérisait par l'absence d'une traînée fluorescente causée par la migration de plusieurs fragments d'ADN de faibles masses moléculaires.



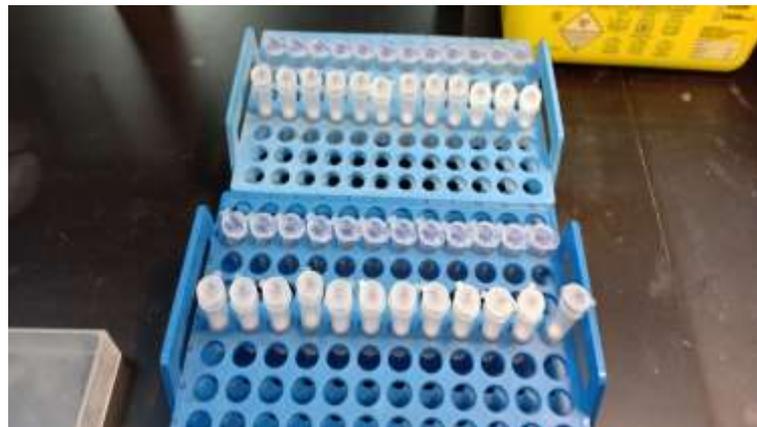
**Figure 58** : **A**: dépôt de l'ADN dans le gel d'agarose **B** : photographie de la migration

### \*Purification (mi-PCR Purification Kit, metabion)



**Figure 59** : kit de purification de l'ADN (mi-PCR Purification Kit, metabion)

-prendre de nouveaux tubes eppendorfs les numérotés selon les codes de chaque échantillon



**Figure 60** : Tubes de purification d'ADN

- Prendre 500µl du PX Buffer et mélanger avec l'ADN de chaque échantillon
- mettre le tous dans les tubes du kit avec membrane
- centrifugez à 13 000 pm pendant 1min
- Rejetez le culot et remettre à nouveau
- Rajoutez 500µl du WN Buffer dans les tubes à membrane (qui est chargé + pour emprisonner l'ADN)
- Centrifugez à nouveau pendant 1min à 13 000pm

- Rejetez le culot et remettre en place le tube
- Rajoutez 500 $\mu$ l du WS Buffer dans les tubes à membrane
- Centrifugez pendant 1min à 13 000pm
- Jetez le culot
- Recentrifugez pendant 5 min (pour enlever tout les résidus d'éthanol).
- Mettre les tubes à membrane dans les nouveaux tubes eppendorfs numérotés avec les codes associés
- Rajoutez 25  $\mu$ l de Elotion Buffer (qui va aller changer la charge de la membrane) pour libérer l'ADN .
- Attendre 2-3 min après centrifugez 2 min à 13 000 pm
- Jetez les tubes à membrane et refermez les tubes contenant le culot

### **\*Quantification**

- Prendre d'autres tubes eppendorfs mettre 98 $\mu$ l d'eau distillée
- Rajoutez 2 $\mu$ l de l'ADN purifié
- prendre le tous (100 $\mu$ l) dans la cuve et calculer l'absorbance ; 260 (ADN), 280 (protéines), 230 (sels) (Figure 61).



**Figure 61** : Eppendorf BioPhotometer pour la quantification de l'ADN

### **\*Séquençage :**

Tous les produits de PCR ont été séquencés en utilisant des amorces directes (sens) dans les installations de séquençage de Macrogen (Macrogen Inc., Séoul, Corée)

### **\*L'analyse des données**

**Seaview 3.2** (Galtier et al. 1996) a été utilisé pour effectuer plusieurs alignements pour chaque marqueur génétique. Les séquences des deux gènes mitochondriaux ont été traduites en acides aminés pour vérifier l'amplification possible des pseudogènes. Des séquences représentatives de *F. hepatica*, *F. gigantica* et du *Fasciola aspermique* disponible dans GenBank ont été incluses dans les trois ensembles de données (ITS, COI et NADI).

**Les diversités d'haplotype (Hd) et de nucléotide ( $\pi$ )** ont été estimées et la distribution de mismatch des deux marqueurs mitochondriaux a été construite à l'aide de DnaSP v 5.10 (Librado et Rozas 2009).

**Le D de Tajima (Tajima 1989) et les F de Fu (Fu 1997)** ont été réalisés pour évaluer l'hypothèse de neutralité sélective des séquences d'ADNmt et l'équilibre de la dérive des mutations de population.

En outre, la structure génétique de *F. hepatica* en Algérie a été estimée via une analyse spatiale de la variance moléculaire (**AMOVA**) mise en œuvre dans Arlequin 3.5 (Excoffier et al. 2005). Les populations étudiées ont été regroupées en fonction de leur origine, populations est et ouest. Les niveaux de signification des statistiques caractérisant la variation à différents niveaux hiérarchiques ont été évalués sur 10 000 permutations.

**Les relations évolutives entre les haplotypes mitochondriaux** ont été analysées pour les deux marqueurs NADI et COI, par median-joining network (Bandelt et al. 1999) construit avec **Network 5.0** (Fluxus Technology Ltd.).

Les analyse de Neighbor joining (NJ) et de maximum likelihood (ML) ont été réalisées pour déduire les relations entre les haplotypes NADI et COI en utilisant respectivement Seaview 3.2 et RAxML (Stamatakis 2006). *Fascioloides magna* (EF535001, EF534997) a été inclus en tant que groupe externe. Dans les deux types de construction, la prise en charge de bootstrap a été évaluée par 1000 pseudoreplicats.

## ***CHAPITRE III : RESULTATS***

## 1<sup>ère</sup> partie : Résultats de la fasciolose à *Fasciola hepatica*

**I-Prévalence totale de la fasciolose à *Fasciola hepatica* au niveau des abattoirs des trois wilayas (Bouira, Tizi-Ouzou, Béjaia) :** Après élaboration de quatre techniques de diagnostique.

Des prélèvements de bile de matières fécales et de sang sur tubes secs ont été effectués sur un total de 4700 bovins en plus de l'inspection des foies au niveau des abattoirs,

-Après réalisation des différentes techniques de diagnostiques à savoir :

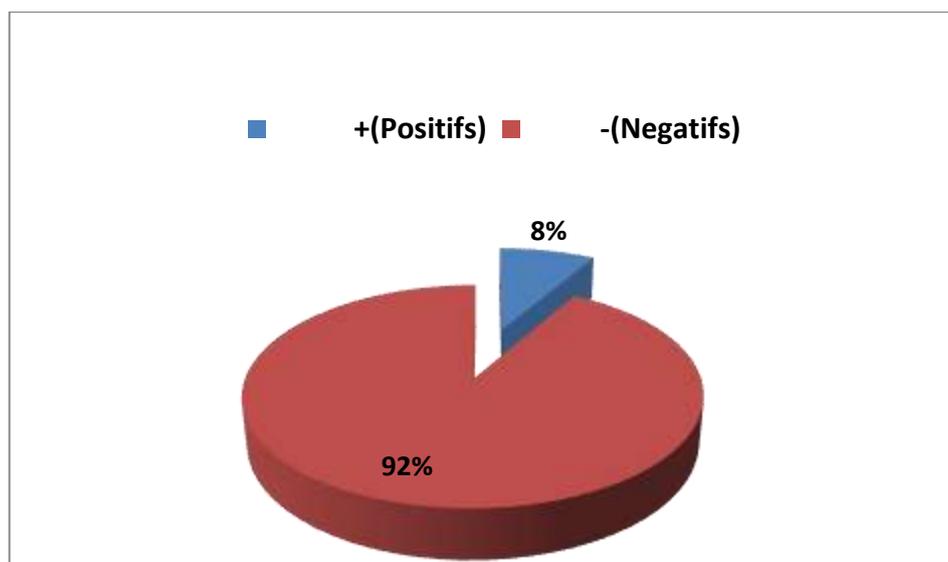
1-Inspection des foies, (sur 4700 bovins) ,

2- analyses coprologiques, (sur 4700 bovins)

3-Analyses de la bile, (sur 4700 bovins),

4- Analyses sérologiques des sérums de bovins positifs, douteux et présentant un foie sain (sur 675 sérums bovins).

A l'issue de ces quatre techniques de diagnostique la prévalence totale de la fasciolose chez les 4700 bovins échantillonnés est de 8.27% (389 sur 4700). (Figure 62).

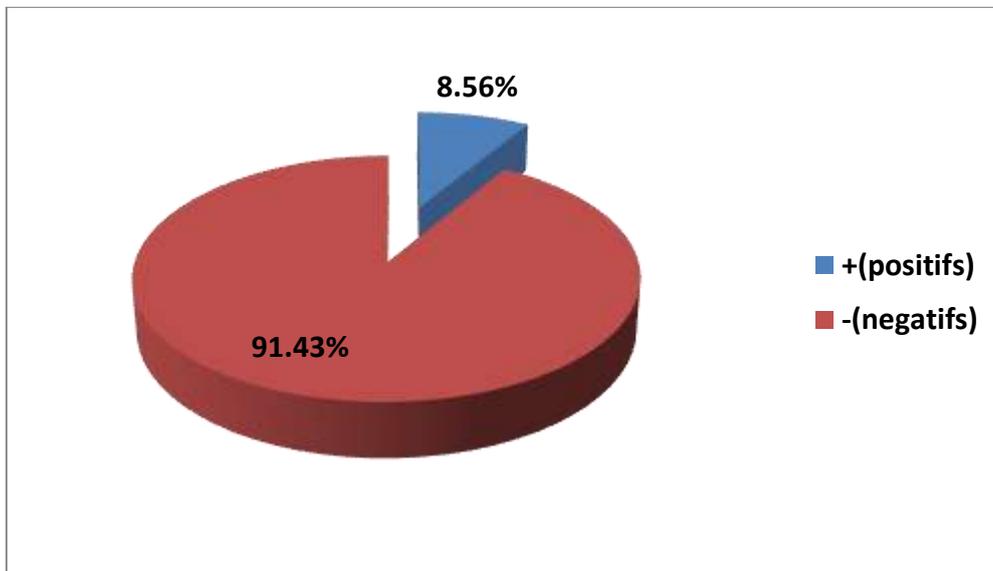


**Figure 62 :** Secteur 3D représentant la Prévalence totale de la fasciolose au niveau des trois wilayas

## I.1.Prévalence totale selon les localités (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaïa) :

### I.1.1.Tizi-Ouzou :

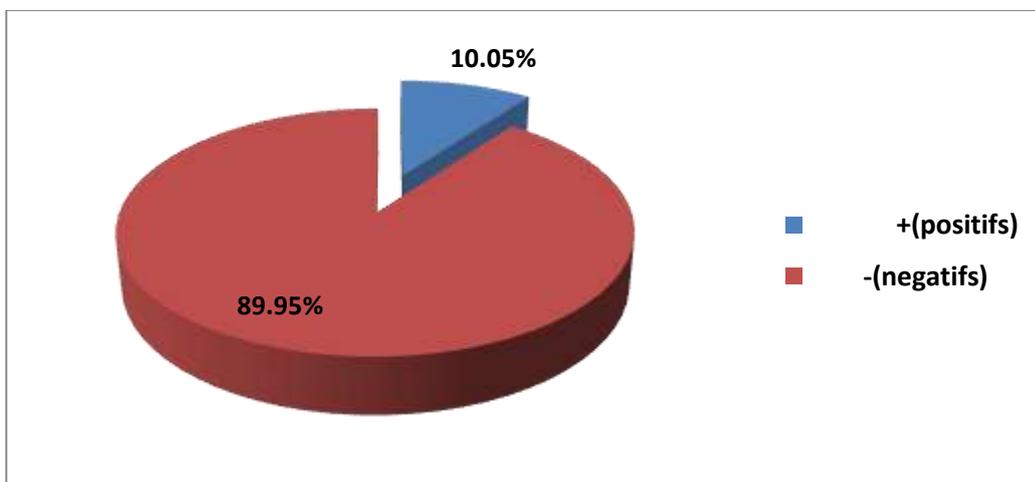
Sur les 1658 bovins provenant de la wilaya de Tizi-Ouzou 8.56% (142 sur 1658) étaient positifs à *Fasciola hepatica*.Figure 63).



**Figure 63:** Secteur 3D représentant la Prévalence totale de la fasciolose au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou

### I.1.2.Bouira :

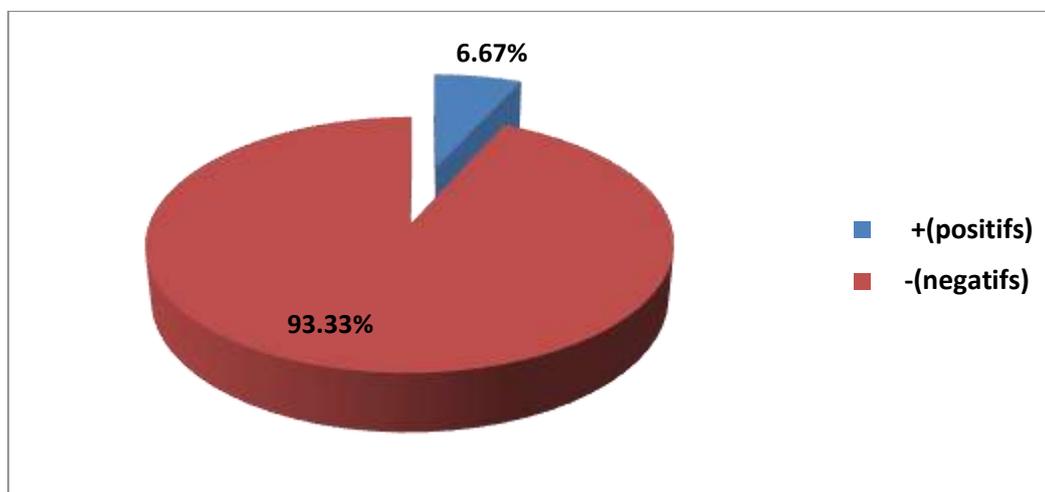
Sur les 1304 bovins provenant de la wilaya de Bouira 10.04% (131sur 1304) étaient positifs à *Fasciola hepatica* (Figure 64)



**Figure 64:** Secteur 3D représentant la Prévalence totale de la fasciolose au niveau de la wilaya de Bouira

### I.1.3.Bejaia :

Sur les 1738 bovins provenant de la wilaya de Béjaia 6.67% (116 sur 1738) étaient positifs à *Fasciola hepatica*. (Figure 65)



**Figure 65:** Secteur 3D représentant la Prévalence totale de la fasciolose au niveau de la wilaya de Béjaia

## II-Résultats des différentes techniques de diagnostique :

### II-1-Inspection des foies au niveau des abattoirs (des trois wilayas)

Après éviscération de la carcasse, l'inspection des foies au niveau des abattoirs sur les 4700 bovins a révélé une prévalence totale de cholangite distomienne de 6.9% (325 bovins positifs), 5.02% des bovins quant à eux présentaient une cholangite non distomienne soit (236 bovins).(Tableau XII),(Figure66).

**Tableau XII :** Résultats de l'inspection des foies au niveau des abattoirs (des trois wilayas).

Chol+dist+	Chol+dist-	Sain	Total
325(6.915%)	236(5.021%)	4139(88.064%)	4700(100.000%)



**Figure 66** : photos présentant des foies atteints de la fasciolose (photos Chougar L., 2017).

### II.1.1.Prévalence selon les localités (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaïa) :

#### II.1.1.1.Tizi-Ouzou :

L'inspection des foies au niveau des abattoirs de la wilaya de Tizi-Ouzou a révélé une prévalence de cholangite distomienne de 6.87%.(Tableau XIII).

**Tableau XIII:** Résultats de l'inspection des foies au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou

Chol+dist+	Chol+dist-	Sain	Total
<b>114(6.876%)</b>	123(7.419%)	1421(85.706%)	1658(100.000%)

#### II.1.1.2.Bouira:

L'inspection des foies au niveau des abattoirs de la wilaya de Bouira a révélé une prévalence de cholangite distomienne 8.28%,(Tableau XIV).et une prévalence de cholangite non distomienne du 2.99%.

**Tableau XIV:** résultats de l'inspection des foies au niveau de la wilaya de Bouira

Chol+dist+	Chol+dist-	Sain	Total
<b>108(8.282%)</b>	39(2.991%)	1157(88.727%)	1304(100.000%)

### II.1.1.3.Bejaia :

L'inspection des foies au niveau des abattoirs de la wilaya de Béjaia a révélé une prévalence de cholangite distomienne de 5.93%, et une prévalence de cholangite non distomienne de 4.26% (Tableau XV).

**Tableau XV:** résultats de l'inspection des foies au niveau de la wilaya de Bejaia

Chol+dist+	Chol+dist-	Sain	Total
103(5.926%)	74(4.258%)	1561(89.816%)	1738(100.000%)

### II-2-Résultats des analyses coprologiques (des trois wilayas) :

Après récolte des matières fécales, l'utilisation des deux techniques de diagnostique (sédimentation et flottaison) nous a permis de détecter la présence d'œufs de *Fasciola hepatica* chez seulement 149 bovins soit une prévalence de 3.17%.(Tableau XVI)

**Tableau XVI:** Résultats de l'analyse coprologique au niveau des trois wilayas

+(Présence d'œufs)	-(Absence d'œufs)	Total
149 (3.170%)	4551(96.830%)	4700 (100.000%)

### II.2.1.Prévalence selon les localités (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaïa) :

#### II.2.1.1.Tizi-Ouzou :

Sur les 1658 prélèvements fécaux L'analyse coprologique nous a permis de détecter la présence d'œufs de *Fasciola hepatica* chez seulement 53 bovins soit une prévalence de 3.19%.(Tableau XVII).

**Tableau XVII:** Résultats de l'analyse coprologique au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou

+(Présence d'œufs)	-(Absence d'œufs)	Total
53 (3.197%)	1605(96.803%)	1658(100.000%)

### II.2.1.2.Bouira:

L'analyse coprologique nous a permis de détecter la présence d'œufs de *Fasciola hepatica* chez seulement 45 bovins soit une prévalence de 3.45%.(Tableau XVIII).

**Tableau XVIII** : résultats de l'analyse coprologique au niveau de la wilaya de Bouira

+(Présence d'œufs)	-(Absence d'œufs)	Total
<b>45 (3.451%)</b>	1259(96.549%)	1304(100.000%)

### II.2.1.3.Bejaia :

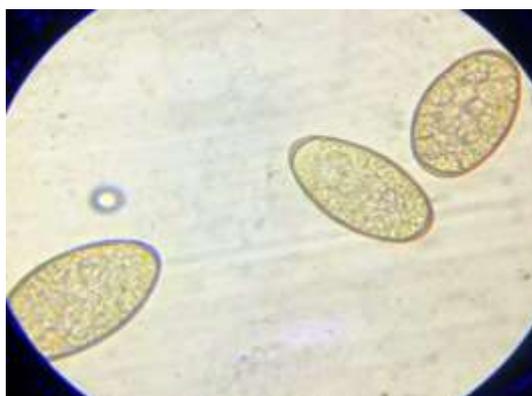
L'analyse coprologique nous a permis de détecter la présence d'œufs de *Fasciola hepatica* chez seulement 51 bovins soit une prévalence de 2.93%. (Tableau XIX).

**Tableau XIX**: résultats de l'analyse coprologique au niveau de la wilaya de Bejaia

+(Présence d'œufs)	-(Absence d'œufs)	Total
<b>51(2.934%)</b>	1687(97.066%)	1738(100.000%)

### II-3-Résultats de l'analyse de la bile (des trois wilayas) :

Après centrifugation l'analyse du culot biliaire a révélé la présence d'œufs du parasite chez 315 bovins soit une prévalence de 6.7% (Figure 67).



**Figure 67** : œufs de *Fasciola hepatica* dans la bile (Gr. X 400) (photo Chougar L.,2017)

**Tableau XX** : Résultats de l'analyse de la bile (des trois wilayas)

+(Présence d'œufs)	-(Absence d'œufs)	Total
<b>315(6.702%)</b>	4385(93.298%)	4700(100%)

**II.3.1.Prévalence selon les localités (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaïa) :**

**II.3.1.1.Tizi-Ouzou :**

L'analyse du culot biliaire a révélé la présence d'œufs du parasite chez 109 bovins soit une prévalence de 6.57%. (Tableau XXI).

**Tableau XXI:** résultats de l'analyse de la bile au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou

+(Présence d'œufs)	-(Absence d'œufs)	Total
<b>109(6.574%)</b>	1549(93.426%)	1658(100.000%)

**II.3.1.2.Bouira:**

L'analyse du culot biliaire a révélé la présence d'œufs du parasite chez 107 bovins soit une prévalence de 8.2%. (Tableau XXII).

**Tableau XXII:** résultats de l'analyse de la bile au niveau de la wilaya de Bouira

+(Présence d'œufs)	-(Absence d'œufs)	Total
<b>107(8.206%)</b>	1197(91.794%)	1304(100.000%)

**II.3.1.3.Bejaia :**

L'analyse du culot biliaire a révélé la présence d'œufs du parasite chez 99 bovins soit une prévalence de 5.69%. (Tableau XXIII).

**Tableau XXIII:** résultats de l'analyse de la bile au niveau de la wilaya de Bejaia

+(Présence d'œufs)	-(Absence d'œufs)	Total
<b>99(5.696%)</b>	1639(94.304%)	1738(100.000%)

## **II-4-Résultats de l'analyse sérologique des sérums de bovins positifs et les douteux, et quelques négatifs (sur 675 sérums de bovins) :**

### **II-4-1-Résultats de la sérologie :**

Sur un total de 4700 sérums ,675 (325 infestés, 236 avec lésions hépatiques sans présence du parasite et 114 avec foies macroscopiquement sains) sérums de bovins abattus, ont fait l'objet d'une analyse sérologique.

L'analyse sérologique des 675 sérums par la méthode ELISA a révélé une plus grande positivité des bovins soit 384 (56.9%) sérums se sont révélés être séropositifs, 12 (1.78%) seulement se sont révélés douteux et 279 (41.33%) séronégatifs.

La séropositivité des bovins au niveau des trois wilayas Tizi-Ouzou, Bouira et Béjaia était respectivement de 56.05% ,59.45% et 55.24%.

L'analyse sérologique a révélé une grande variation dans les taux d'anticorps chez les bovins positifs à savoir sur les 56.9% de bovins séropositifs 12.29% présentaient un faible taux d'anticorps ( $15\% < VAL < 45\%$ ), 16.44% présentaient un taux d'anticorps moyens ( $45\% < VAL < 75\%$ ), et 28.15% des bovins présentaient quant à eux des taux d'anticorps élevés ( $75\% < VAL$ ).

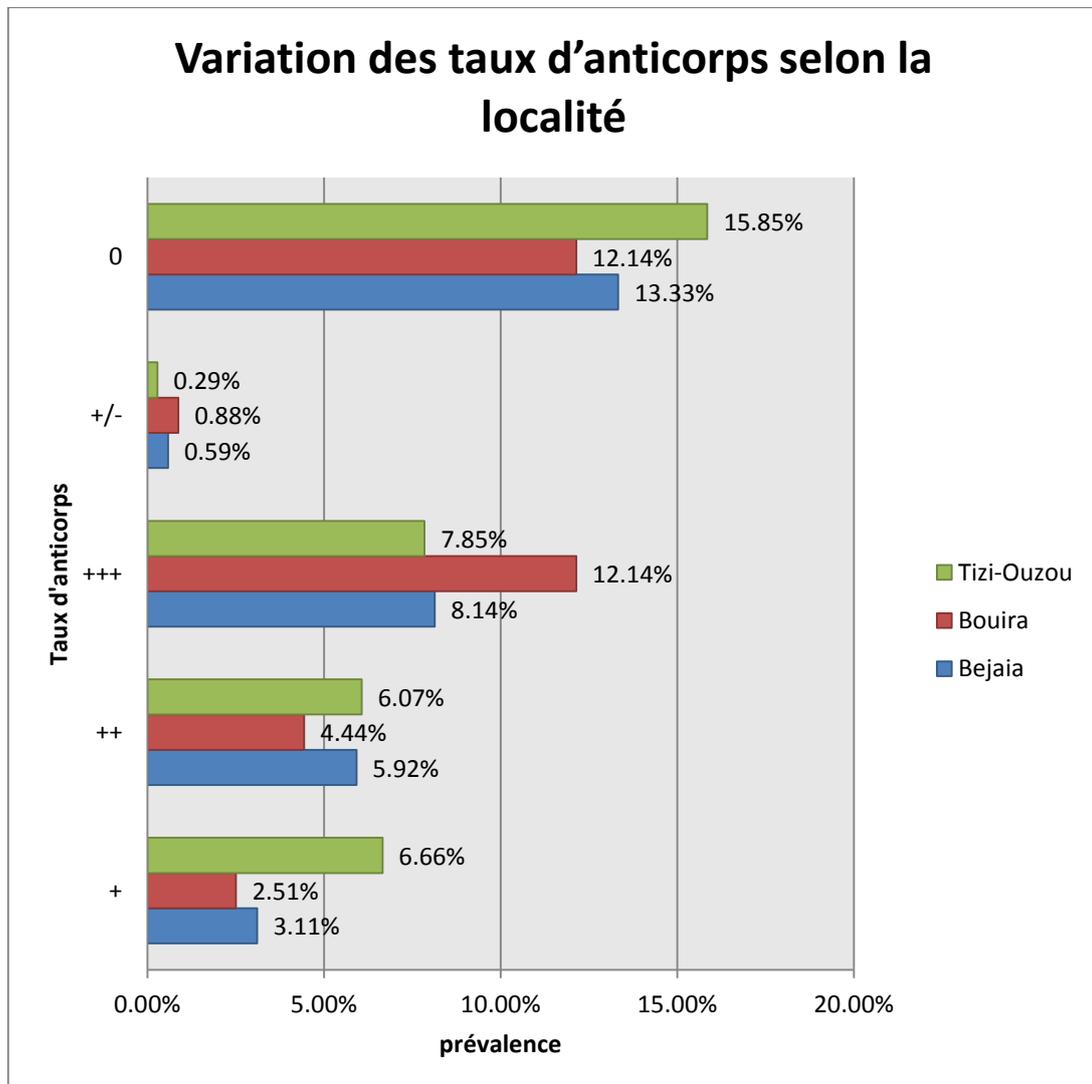
## **II.4.2.Etude des facteurs de risque de la variation des taux d'anticorps :**

### **II.4.2.1.Variation des taux d'anticorps selon la localité :**

Notre étude statistique a révélé l'existence d'une association significative entre les variations des taux d'anticorps chez les bovins selon la localité d'origine  $P < 0.001$  (Figure 68).

Ainsi nous notons que la localité présentant le taux d'anticorps le plus élevé est celle de Bouira avec 82(12.15%) des bovins révélant des valeurs ( $VAL > 75\%$ ) ce qui correspondait à de fortes infestations des bovins et la localité présentant les taux les plus bas est celle de Tizi-Ouzou avec 45(6.66%) des bovins présentant des taux d'anticorps

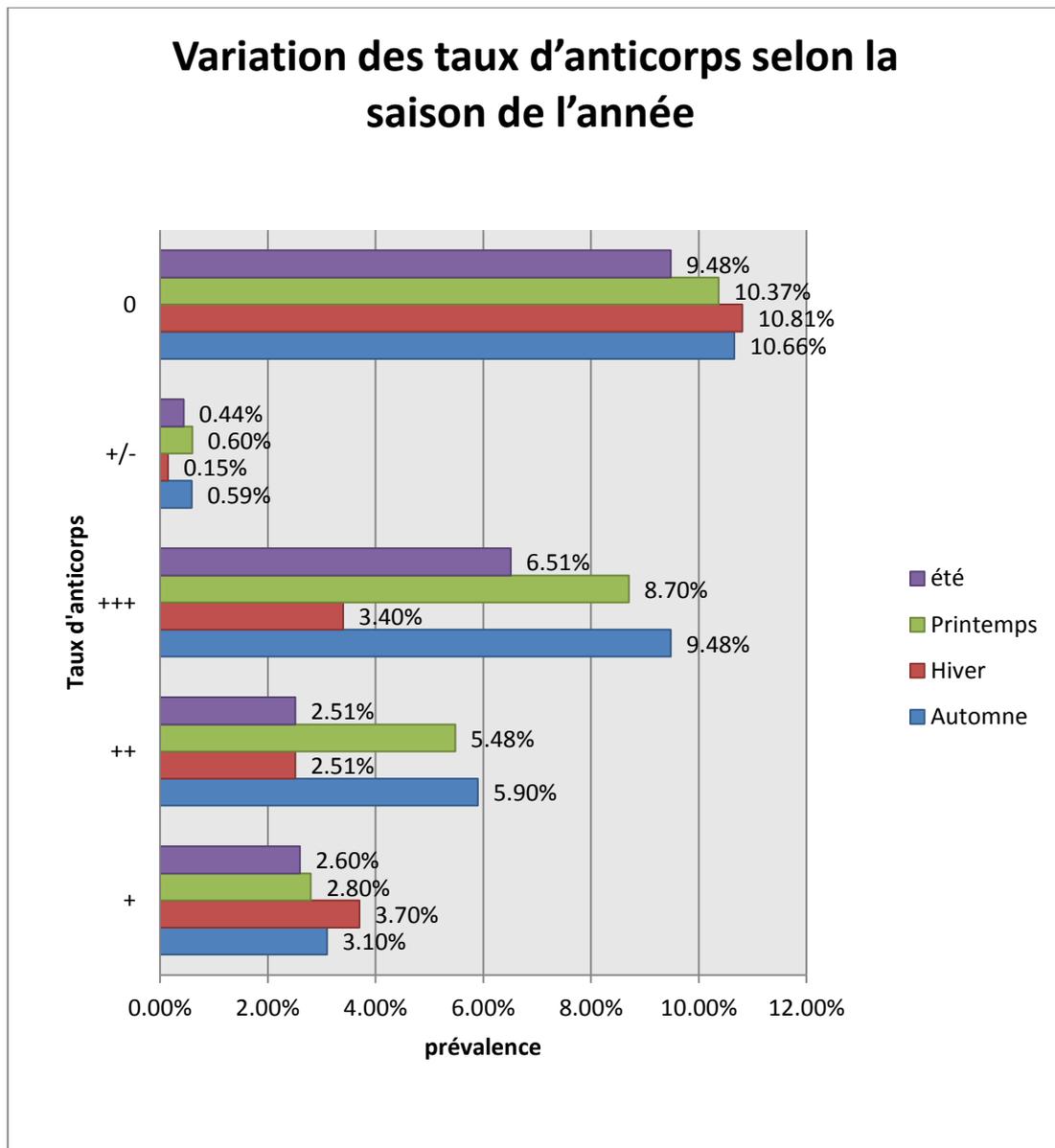
compris entre (15%<val>45%) qui correspondaient au niveau hépatique à de faibles infestations.(Figure 68).



**Figure 68 :** Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon la localité

#### II.4.2.2.Variation des taux d'anticorps selon la saison de l'année :

Les taux d'anticorps les plus élevés ont été enregistrés durant la saison de l'Automne avec 64(9.48%) présentant des valeurs supérieures à (VAL>75%), suivie de celle du Printemps avec 59(8.74%), tandis que les taux les plus faibles seront enregistrés en hiver avec 25(3.7%) présentant des valeurs comprises entre (15%<VAL<45%) (Figure 69).l'analyse statistique a révélé une association significative entre le taux d'anticorps révélé en ELISA et la saison de l'année (p<0.01).

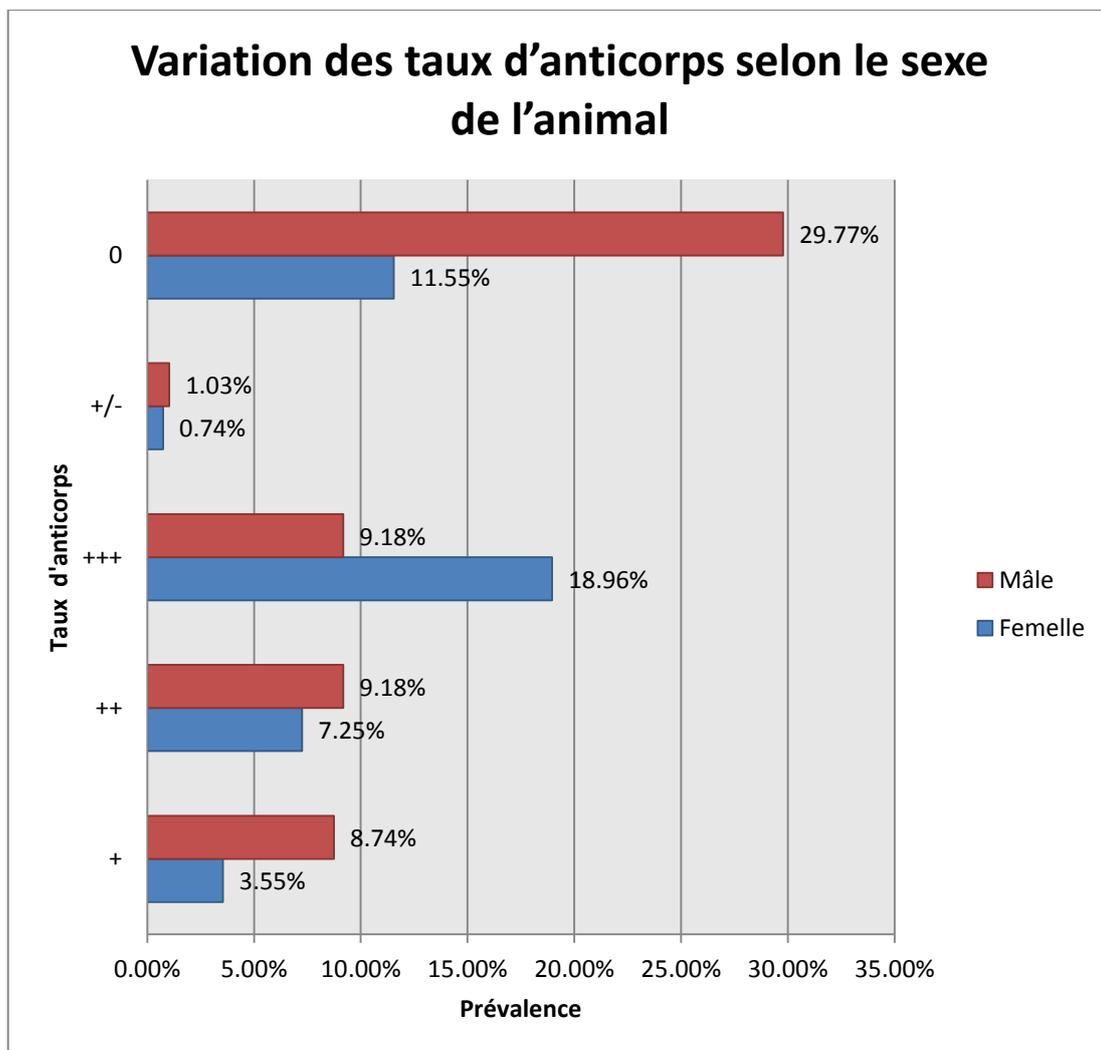


**Figure 69:** Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon la saison de l'année

#### II.4.2.3. Variation des taux d'anticorps selon le sexe de l'animal:

Les taux d'anticorps les plus élevés avec des ( $VAL > 75\%$ ) semblent être plus fréquemment rencontrés chez les femelles 128 (18.96%), contrairement aux mâles où nous rencontrons ces valeurs que chez 62 (9.18%) soit presque la moitié, tandis que les valeurs d'anticorps les plus faibles ( $15\% < VAL < 45\%$ ) sont enregistrées chez les mâles 59 (8.74%). (Figure 70)

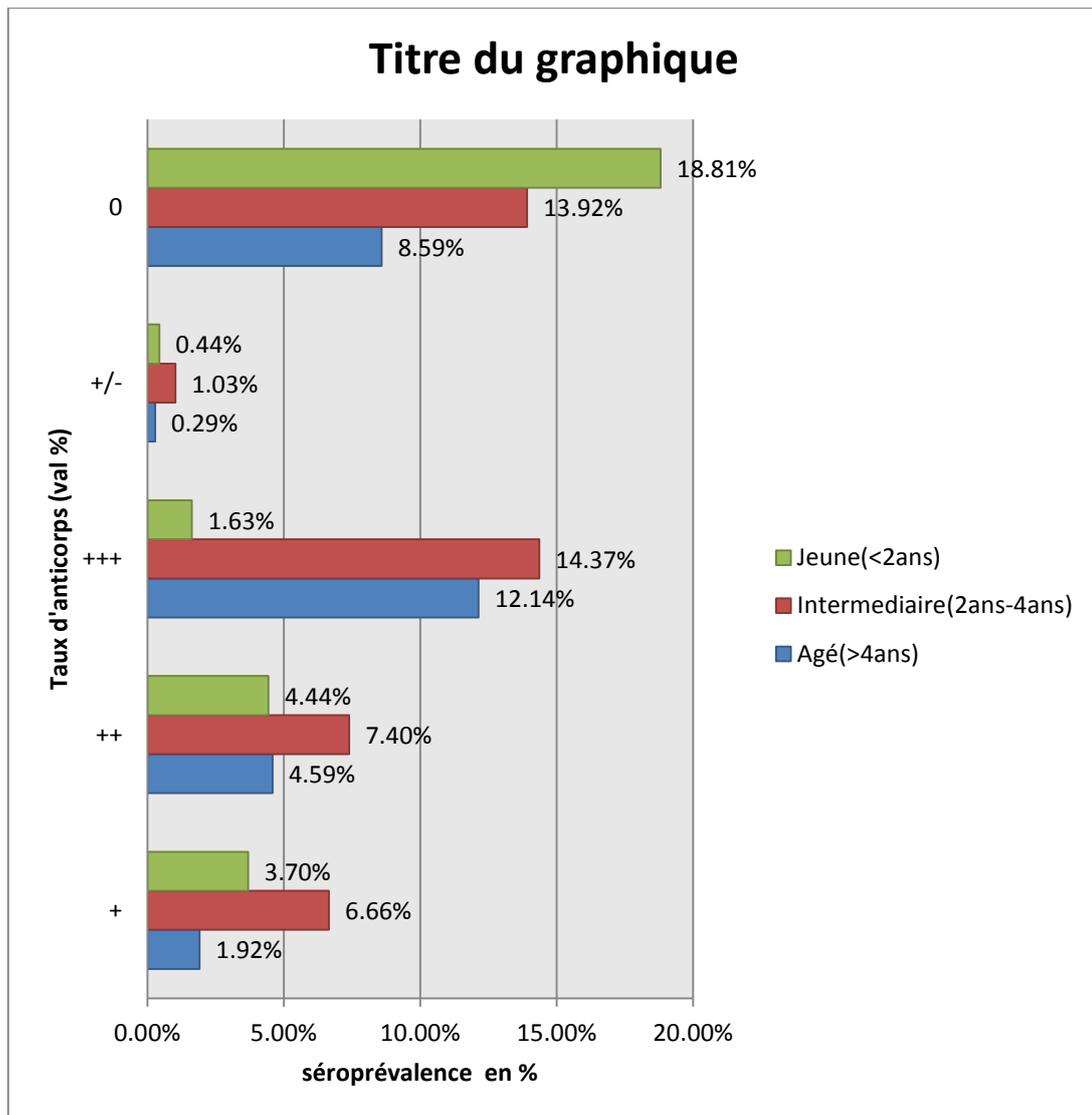
Ainsi une association significative a été notée entre les variations d'anticorps et le sexe de l'animal ( $P < 0.01$ )



**Figure 70:** Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon le sexe de l'animal

#### II.4.2.4. Variation des taux d'anticorps selon l'âge de l'animal :

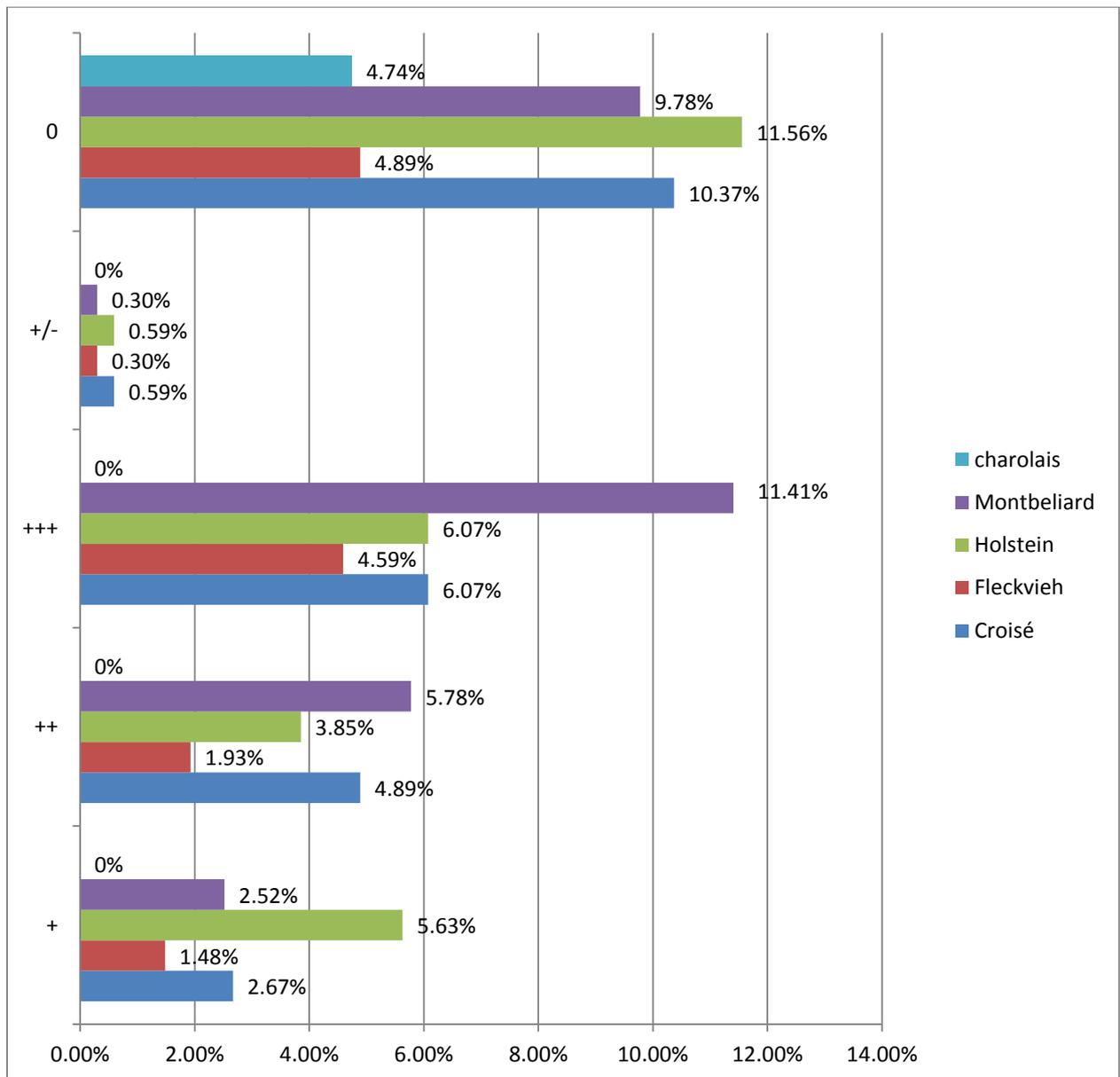
Nos résultats montrent des taux d'anticorps plus élevés ( $val > 75\%$ ) chez les animaux dont la classe d'âge est ( $\text{âge} > 4\text{ans}$ ,  $2\text{ans} > \text{âge} < 4\text{ans}$ ) avec des prévalences de 12.14% et 14.37% respectivement contre seulement 1.63% chez les jeunes ( $\text{âge} < 2\text{ans}$ ). Tandis que les taux d'anticorps les plus faibles ( $15\% < val < 45\%$ ) ont été notés chez les animaux plus jeunes dont la classe d'âge est ( $2\text{ans} > \text{âge} < 4\text{ans}$ ,  $\text{âge} < 2\text{ans}$ ) avec des prévalences respectives de 6.66% et 3.7% contre seulement 1.92% pour les animaux âgés ( $\text{âge} > 4\text{ans}$ ) (Figure 71). Ainsi une association significative a été notée entre les variations d'anticorps et la classe d'âge de l'animal ( $P < 0.01$ )



**Figure 71** : barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon l'âge de l'animal

#### II.4.2.5. Variation des taux d'anticorps selon la race de l'animal:

Selon nos résultats les taux d'anticorps les plus élevés (Val>75%) ont été notés chez la race Montbéliarde avec 11.4% suivie de la race Croisé et Holstein avec 6.07% chacune et enfin la race Fleckvieh avec 4.59%. Tandis que les taux d'anticorps les plus faibles (15%<val<45%) ont été plus fréquemment notés chez la race Holstein avec 5.63%. Notre test statistique a révélé l'existence d'une association significative entre les taux d'anticorps et la race de l'animal  $P < 0.001$  (Figure 72)



**Figure 72:** Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon la race de l'animal

#### **II.4.2.6. Relation entre les lésions à l'inspection des foies et les taux d'anticorps révélés en ELISA :**

Un total de 675 sérums de bovins ont fait l'objet d'une analyse sérologique (ELISA), les sérums correspondaient au 325 bovins présentant une cholangite distomienne et 236 présentant une cholangite non distomienne et 114 sérums de bovins sélectionnés

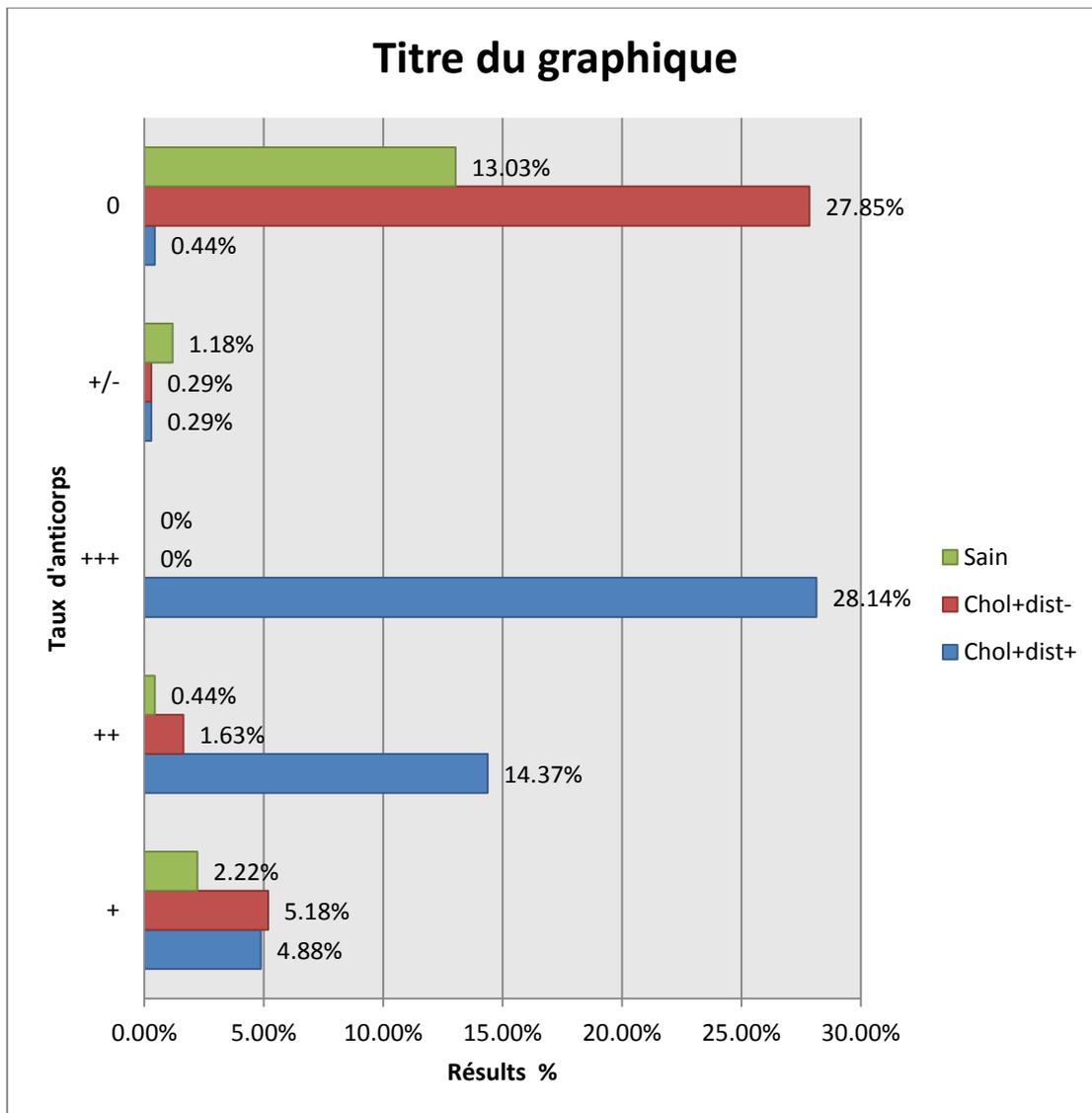
aléatoirement à partir de bovins présentant un foie sain à l'inspection, les résultats sont illustrés dans la (Figure 73).

Notre analyse statistique a révélé l'existence d'une relation significative entre le degré de l'atteinte hépatique et le taux d'anticorps révélé en ELISA ( $P < 0.001$ ).

Selon nos résultats les sérums de bovins présentant des taux d'anticorps élevés dont les valeurs étaient supérieures à ( $VAL > 75\%$ ), tous correspondaient à l'inspection aux abattoirs à des foies présentant des lésions hépatiques, avec inflammation des canaux biliaires et présence du parasite *Fasciola hepatica* (cholangite distomienne), soit une séroprévalence de 28.14%.

Les taux d'anticorps moyennement positifs compris entre ( $45\% < val < 75\%$ ) correspondaient majoritairement à des foies présentant une cholangite distomienne (à 14.37%) contre seulement 1.63% à des foies présentant une cholangite non distomienne c'est-à-dire des lésions hépatiques sans présence du parasite, et 0.44% de cette catégorie correspondaient à des foies macroscopiquement sains.

Les sérums présentant des taux d'anticorps faibles ( $15\% < val < 45\%$ ) correspondaient à 5.18% à des foies présentant une cholangite non distomienne, à 4.88% à des foies infestés présentant des cholangites distomiennes et à 2.22% à des foies macroscopiquement sains. (voir Figure 73) (Annexe 7)



**Figure 73** : Barres représentatives de la variation des taux d'anticorps selon les résultats de l'inspection des foies.

## II.5.Résultats de l'analyse moléculaire

### II.5.1.Prévalence globale de la fasciolose au niveau des huit wilayates : (de janvier à décembre 2017)

La prévalence globale de la fasciolose chez les bovins du nord de l'Algérie était de 5,1% (n = 87). En comparant les wilayates, la prévalence a varié de 2,3% (Tissemsilt) à 22,0% (Souk-Ahras) (Tableau XXIV). En ce qui concerne la wilaya de Bejaïa, la prévalence globale était de 5,8% et entre les différentes communes, elle variait de 3,2% (Chemini) à 11,5% (Kherrata). Toutes les douves étaient en forme de feuille présentant un angle de corps oblique avec des épaules apparentes, des caractères morphologiques spécifiques à

*F. hepatica*. Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) n'a montré aucune différence significative entre les échantillons de l'est et de l'ouest pour tous les paramètres (largeur de corps, longueur de corps et rapport longueur et largeur du corps) (Tableau XXV).

**Tableau XXIV:** Nombre de bovins abattus et prévalence des foies infectés par la fasciolose dans les wilayates d'Algérie

Wilaya	Commune	N. examinés	Prévalence+ %
<b>Bejaïa (A)</b>	Akbou (1)	<b>95</b>	10.5
	Adekar (2)	<b>77</b>	10.4
	El Kseur (3)	<b>81</b>	4.9
	Seddouk (4)	<b>65</b>	6.2
	Amizour (5)	<b>96</b>	6.3
	Kherrata (6)	<b>61</b>	11.5
	Sidi-Aïch (7)	<b>106</b>	4.7
	Béjaïa (8)	<b>83</b>	2.4
	Ouzellaguen (9)	<b>87</b>	4.6
	Beni Maouche (10)	<b>80</b>	3.8
	Darguina (11)	<b>73</b>	6.8
	Chemini (12)	<b>187</b>	3.2
<b>Tiaret (B)</b>		122	2.45
<b>Souk-Ahras (C)</b>		18	22.3
<b>Ain-Temouchent (D)</b>		113	4.42
<b>Batna (E)</b>		30	6.72
<b>Médéa (F)</b>		88	3.4
<b>Tlemcen (G)</b>		111	2.7
<b>Tissemsilt (H)</b>		128	2.34
<b>TOTAL</b>		1701	5.1

**Tableau XXV:** Résultats de l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA) pour la largeur, la longueur et le rapport longueur et largeur du corps. Les groupes correspondent aux wilayates de l'est et de l'ouest du nord de l'Algérie.

	<b>Source of variation</b>	<b>Sum of squares</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>longueur</b>	Entre groupes	0.45	1	2.38	0.125
	Within groups	26.20	138		
	<b>Total</b>	26.65	139		
<b>Largeur</b>	Entre groupes	0.33	1	3.64	0.14
	Within groups	6.97	138		
	<b>Total</b>	7.30	139		
<b>ratio longueur /Largeur</b>	Entre groupes	0.72	1	5.23	0.23
	Within groups	29.20	138		
	<b>Total</b>	29.92	139		

### II.5.2. Résultats de l'analyse moléculaire

Le séquençage des fragments ITS a donné une séquence d'une longueur d'environ 959 pb. (Annexes 5). L'annotation des ITS a été déduite de multiples alignements avec *Fasciola* spp. Séquences disponibles dans GenBank. Ce marqueur génétique comprend un fragment partiel 18S de 41 pb, des séquences entières des ITS-1 et 5.8S, respectivement de 435 pb et 137 pb, et une séquence entière d'ITS-2 de 346 pb (Tableau XXVI).

**Tableau XXVI :** Détails des séquences ITS de *Fasciola* d'Algérie et d'autres pays

	ITS1					ITS2												
	50	140	234	312	332	823	847	874	886	892	935	943	950	957	958			
<i>F. gigantica</i> Niger	T	T	T	A	T	C	C	T	T	C	T	-	A	A	T	AM900371	Ali et al., (2008)	
Egypt	T	T	T	A	T	C	C	T	T	C	T	-	A	T	A	EF612472-84	Lotfy et al., (2008)	
China	T	T	T	A	T	C	C	T	T	C	T	-	-	T	A	KF543340	Liu et al., (2014)	
<i>F. hepatica</i> Niger	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	AM900370	Ali et al., (2008)	
Egypt	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	EF612468	Lotfy et al., (2008)	
Spain	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	AM709498	Alasaad et al., (2007)	
Spain	C	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	T	G	T	A	AM709621	Alasaad et al., (2007)	
Bolivia	C	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	T	G	T	A	MG569981	Valero et al., (2018)	
Spain	C	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	T	G	T	A	MG569978	Valero et al., (2018)	
Bolivia	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	MG569977	Valero et al., (2018)	
Mexico	C	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	T	G	T	A	MG569976	Valero et al., (2018)	
Tunisia	C	A	C	T	C	T	T	C	C	<b>C/T</b>	T	T	G	T	A	GQ231546	Farjallah et al., (2009)	
Algeria	C	A	C	T	C	T	T	C	C	<b>C/T</b>	T	T	G	T	A	GQ231547	Farjallah et al., (2009)	
China	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	KX856340	Ai et al., (2017)	
<b>Algeria</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A/T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>MK212149-50</b>	<b>Present study</b>	

Les séquences d'alignement multiple ont confirmé la conservation des ADN<sub>r</sub> 18S et 5.8S au sein de *Fasciola* sp. Les séquences ITS-1 étaient identiques à 100% à celles de *F. hepatica* publiées antérieurement (Itagaki et al. 2005 ; Farjallah et al., 2009; Amor et al. 2011). *F. hepatica* différait de *F. gigantica* par cinq substitutions (Tableau XXVI). L'alignement des séquences ITS-2 a montré dix sites variables au sein de *Fasciola*. En comparant les séquences de *F. hepatica*, deux substitutions différentes générant 3 haplotypes ont été observées (Tableau XXVI). La première substitution, transition, à la position 892 (C / T) différencie l'haplotype commun, FhITS2-H1, décrit dans le monde entier, et la seconde, FhITS2-H2 (numéro d'accès = MK212149), précédemment rapportée en Espagne, Algérie. et récemment en Amérique du Sud (Alasaad et al. 2007 ; Farjallah et al., 2009; Valero et al. 2018).

La deuxième substitution était une transversion située à la position 935 (T / A), indiquant l'existence d'un nouvel haplotype, FhITS2-H3 (numéro d'accès = MK212150), rapporté ici pour **la première fois**. Parmi les 140 *F. hepatica* algériennes, 95 échantillons appartenait à l'haplotype commun FhITS2-H1, ayant un « T » à la position 935 et 35 appartenait au nouvel haplotype FhITS2-H3, ayant un « A » à cette position. Dans les localités est, les deux haplotypes (45% FhITS2-H1, 55% FhITS2-H3) ont été observés. Cependant, FhITS2-H1 est apparu plus abondant dans l'ouest algérien (86%). La diversité des haplotypes (H) variait de 0,503 à l'est à 0,239 à l'ouest.

Selon les résultats d'AMOVA, la plupart des variations au sein des populations expliquent la variation observée pour les COI (95%), les COI-trnT-rrnL (94.1%) et les NADI (86%). AMOVA a révélé que 11,39%, 4,49% et 12,76% de la variation totale de COI, COI-trnT-rrnL et NADI, respectivement, faisaient partie des groupes (Tableau XXVII).

L'amplification de COI-trnT-rrnL a donné des produits de 1031 pb spécifiques de *F. hepatica* (Le et al. 2012). L'alignement des séquences de nucléotides a généré huit haplotypes (numéros d'accès = MK372236–43) différents sur huit sites (Annexe 5). La diversité des nucléotides était faible pour COI-trnT-rrnL ( $n = 0,0017$ ); cependant, la diversité des haplotypes était élevée ( $H_d = 0,802$ ). L'analyse Median-joining network a montré un schéma en étoile. L'haplotype commun FhCOI-trnT-rrnL-H1 (numéro d'accès = MK372236) occupait une position basale dans le réseau (Figure 74 a) et était partagé

par toutes les localités (n = 37, 39%). L'haplotype FhCOI-trnT-rrnL-H3 (numéro d'accès = MK372238) était spécifique à Bejaïa. Les haplotypes restants diffèrent en une seule étape de mutation et ont été détectés dans plus de trois localités (Tableau XXVIII; Figure 74a).

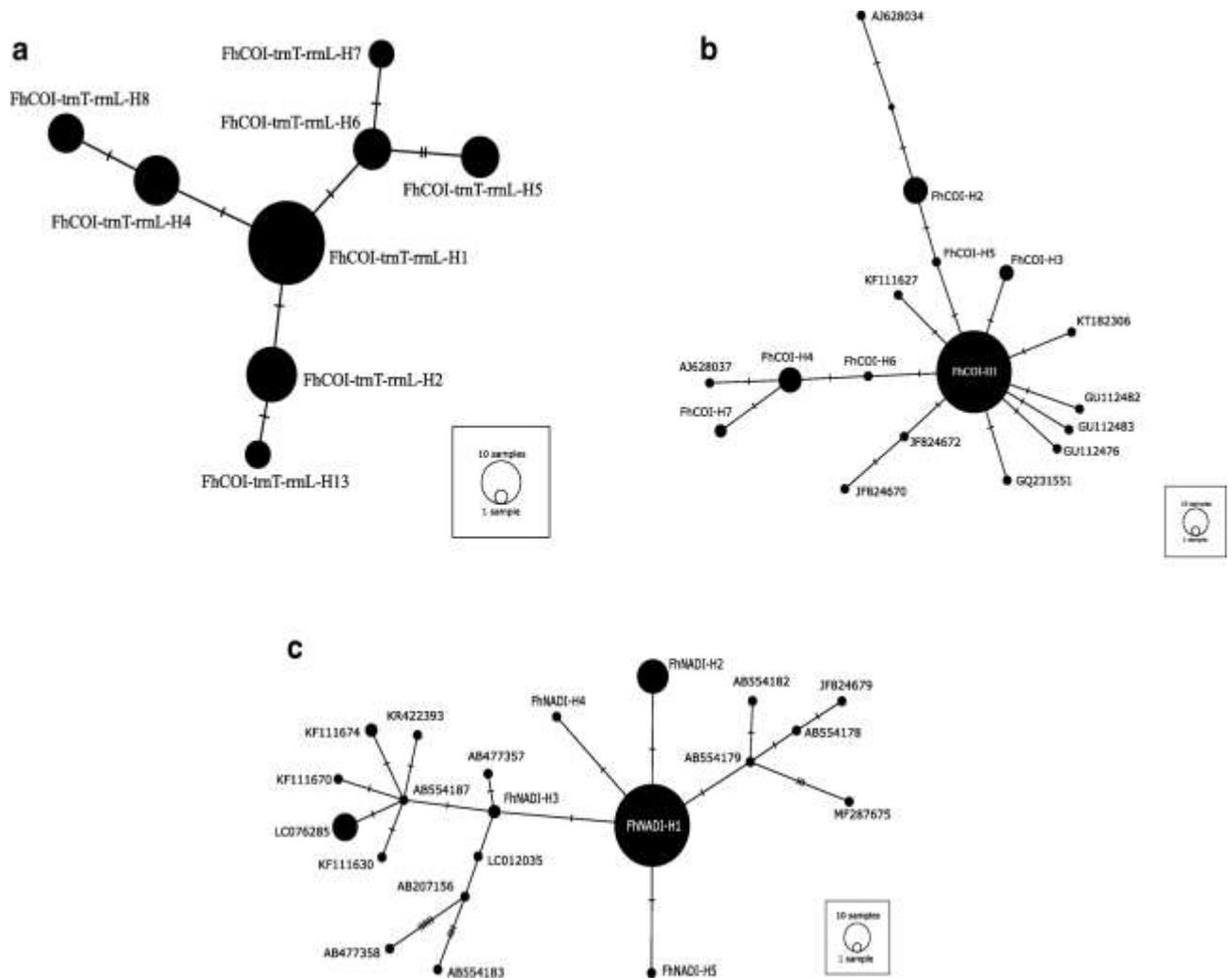
**Tableau XXVII :** Analyse de la variance moléculaire (AMOVA)

Source of variation		Sum of squares	Variance components	% variation	P value
COI-trnT-rrnL	Among groups	7.706	0.03725 Va	4.495	0.030
	Among populations within groups	4.287	0.01155 Vb	1.394	0.013
	Within populations	163.776	0.77989 Vc	94.111	0.000
	<b>Total</b>	<b>175.770</b>	<b>0.82868</b>		
NADI	Among groups	0.933	0.01881 Va	12.76	0.17595
	Among populations within groups	0.829	0.00155 Vb	1.05	0.0567
	Within populations	11.186	0.12712 Vc	86.19	0.000
	<b>Total</b>	<b>12.948</b>	<b>0.14748</b>		
COI	Among groups	1.406	0.03649 Va	11.39	0.04106
	Among populations within groups	0.903	-0.02068 Vb	-6.46	0.0315
	Within populations	26.491	0.30449 Vc	95.07	0.000
	<b>Total</b>	<b>28.800</b>	<b>0.32030</b>		

**Tableau XXVIII:** Détails des séquences COI-trnT-rrnL de *Fasciola hepatica* d'Algérie et d'autres pays.

Marker	Location	Accession number	References	Haplotype
COI	Algeria (all localities)	MK372236	Present study	FhCOI-trnT-rrnL-H1
	Algeria (all localities)	MK372237	Present study	FhCOI-trnT-rrnL-H2
	Algeria (A)	MK372238	Present study	FhCOI-trnT-rrnL-H3
	Algeria (all localities)	MK372239	Present study	FhCOI-trnT-rrnL-H4
	Algeria (all localities)	MK372240	Present study	FhCOI-trnT-rrnL-H5
	Algeria (all localities)	MK372241	Present study	FhCOI-trnT-rrnL-H6
	Algeria (all localities)	MK372242	Present study	FhCOI-trnT-rrnL-H7
	Algeria (all localities)	MK372243	Present study	FhCOI-trnT-rrnL-H8
	Egypt	KU058263	Arafa et al., (2018)	
	Egypt	KU058264	Arafa et al., (2018)	
	Japan	AP017707	Coghlan et al., (2019)	
	Australia	AF216697	Le et al., (2000)	

Wilayas: Bejaïa (A), Tiaret (B), Souk-Ahras (C), Ain-Temouchent (D), Batna (E), Médéa (F), Tlemcen (G), and Tissemsilt (H)



**Figure 74:** Réseau d'haplotype obtenu à partir des séquences COI-trnT-rrnL (a), COI (b) et NADI (c). L'aire de chaque cercle est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype et chaque branche représente une mutation.

L'analyse des séquences partielles de COI (391 pb) a donné sept haplotypes (FhCOI-H1 – FhCOI-H7, numéros d'accèsion = MK212142–48) (Annexe 5), se différenciant sur six sites (Tableau XXIX).

L'ensemble de données COI a montré une faible diversité de nucléotides ( $\pi = 0,0024$ ) et d'haplotypes ( $Hd = 0,428$ ).

L'analyse Median-joining network a généré un motif en étoile (Figure 74b). La majorité des *F. hepatica* Algériennes semble porter l'haplotype FhCOI-H1 occupant une position basale dans le réseau.

La plus grande proportion (70%) des douves appartenant à cet haplotype prédominant provenait de Bejaïa.

Les haplotypes restants sont apparus divergeant de FhCOI-H1 au moins dans un nucléotide. Les haplotypes FhCOI-H2 à FhCOI-H6 ont été observés uniquement à Bejaïa et FhCOI-H5 et FhCOI-H6 étaient uniques.

L'haplotype FhCOI-H7 a été détecté dans deux localités, Tiaret et Ain-Temouchent dans l'ouest algérien.

Après avoir ajouté des séquences représentatives de *F. hepatica* de différents pays à l'ensemble de données COI, le modèle de réseau était le même (Figure 74b). Cela confirme les relations étroites entre les haplotypes de *F. hepatica*.

**Tableau XXIX:** Détails des séquences de *Fasciola* COI d'Algérie et d'autres pays

Marker	Location	Accession number	Reference	Haplotype
COI	Algeria (all localities)	MK212142	Present study	FhCOI-H1
	Algeria (Mostaganem northwest of Algeria)	GQ231549	Farjallah et <i>al.</i> , (2009)	FhCOI-H1
	Tunisia	GQ231548	Farjallah et <i>al.</i> , (2009)	FhCOI-H1
	Egypt	KX470584	Lotfy et <i>al.</i> , (2008)	FhCOI-H1
	Egypt	AB510491	Omar et <i>al.</i> , (2013)	FhCOI-H1
	South Africa	KT182300, 04, 05	Mucheka et <i>al.</i> , (2015)	FhCOI-H1
	France	AJ628039	Dong et <i>al.</i> , (unpublished)	FhCOI-H1
	Turkey	GQ121276	Simsek	FhCOI-H1
	Spain	KF111618	Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez (2014)	FhCOI-H1
	Algeria Bejaïa	MK212143	Present study	FhCOI-H2
	Algeria Bejaïa	MK212144	Present study	FhCOI-H3
	Algeria Bejaïa	MK212145	Present study	FhCOI-H4
	South Africa	KT182260	Mucheka et <i>al.</i> , (2015)	FhCOI-H4
	Tunisia	GQ231550	Farjallah et <i>al.</i> , (2009)	FhCOI-H4

Australia	AF216697	Let et <i>al.</i> , 2000	FhCOI-H4
China	AJ628035, 38	Dong et <i>al.</i> , (unpublished)	FhCOI-H4
Algeria Bejaïa	MK212146	Present study	FhCOI-H5
Algeria Bejaïa	MK212147	Present study	FhCOI-H6
Algeria Tiaret–Ain-Temouchent	MK212148	Present study	FhCOI-H7
Tunisia	GQ231551	Farjallah et <i>al.</i> , (2009)	
Zimbabwe	KT182306	Mucheka et <i>al.</i> , (2015)	
France	GU112476	Ai et <i>al.</i> , (2011)	
Italy	JF824670, 72	Farjallah et al. (2013)	
Spain	KF111627	Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez (2014)	
Japan	AP017707	Coghlan et <i>al.</i> , (2019)	
China	AJ628034	Dong et <i>al.</i> , (unpublished)	
USA	GU112482-3	Ai et <i>al.</i> , (2011)	

---

Les 140 séquences partielles de NADI (525 pb) comprenaient quatre sites variables et généraient cinq haplotypes (FhNADI-H1– FhNADI-H5 (numéros d'accension = MK212137–41)(Annexe 5) (Tableau XXX ; Figure 74c). FhNADI-H1 était l'haplotype le plus commun (80%) et comprenait des échantillons de toutes les localités, 77% de Bejaïa. FhNADI-H2 comprenait exclusivement des échantillons de Bejaïa; FhNADI-H3 n'a été observé qu'à Tlemcen et Souk-Ahras; et FhNADI-H4 et FhNADI-H5 étaient uniques à Ain-Temouchent et Batna, respectivement. La diversité des nucléotides et des haplotypes était très faible ( $\pi = 0,0006$ ,  $Hd = 0,313$ ).

Les haplotypes de référence provenant d'Égypte, d'Uruguay, d'Iran et d'Espagne étaient étroitement apparentés à FhNADI-H1, tandis que les séquences provenant d'Égypte, d'Italie, de France, d'Iran, du Japon, d'Australie et de Chine étaient similaires à FhNADI-H2. Deux haplogroupes supplémentaires ont montré une ségrégation indépendante, une mutation, de FhNADI-H1. Le premier haplogroupe comprenait des douves spermiques d'Égypte, d'Italie et du Brésil. La seconde comprenait une plus grande diversité de *F. hepatica* d'Espagne, de Pologne, d'Irlande, du Japon, de Chine et du Pérou (Tableau XXX; Figure 74c).

Les tests de neutralité (tests D et Fu de Tajima FS) ont montré des valeurs négatives significatives (Tableau XXX1), indiquant un excès de polymorphismes rares dans la population étudiée. Les Mismatch distributions pour les deux marqueurs mitochondriaux étaient unimodales en forme de L et soutenaient l'hypothèse d'un modèle d'expansion soudain (Figure 75 a – c).

**TableauXXX** : Détails des séquences NADI Fasciola d'Algérie et d'autres pays

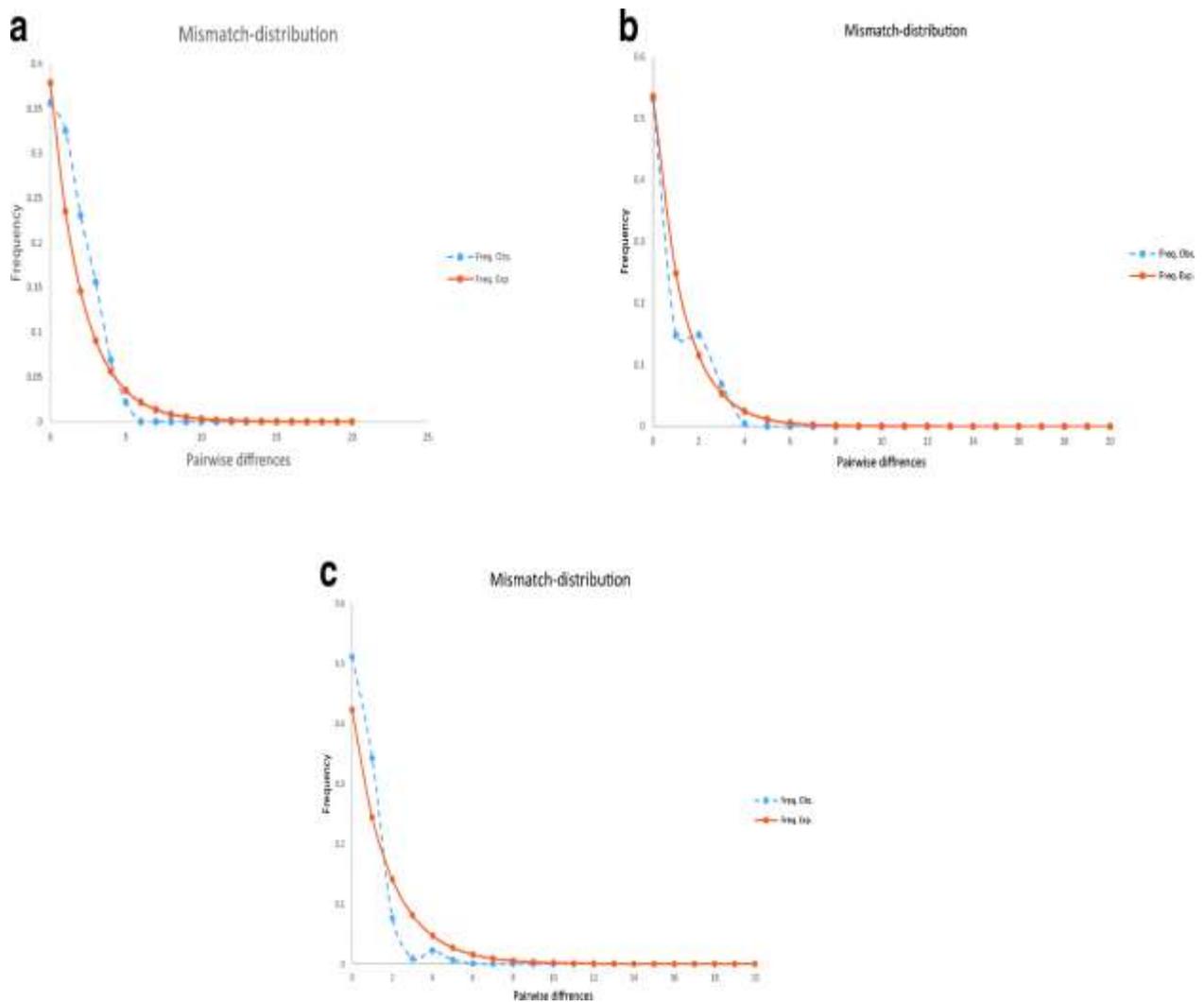
Marker	Location	Accession number	Reference	Haplotype
NAD1	Algeria all localities	MK212137	Present study	FhNADI-H1
	Italy	JF824675	Farjallah et al. (2013)	FhNADI-H1
	France	KJ200623	Wannasan et al. (2014)	FhNADI-H1
	Egypt	AB554177	Amer et al. (2011)	FhNADI-H1
	Egypt	LC076285	Amer et al. (2016)	FhNADI-H1
	Iran	GQ175362	Moazeni et al. (2012)	FhNADI-H1
	Japan	LC228620	Ohari et al. (2017)	FhNADI-H1
	China	AB477363	Peng et al. (2009)	FhNADI-H1
	Australia	AF216697	Le et al. (2000)	FhNADI-H1
	Australia	AB207155	Itagaki et al. (2005)	FhNADI-H1
	Algeria Bejaïa	MK212138	Present study	FhNADI-H2
	Egypt	AB554187, 92	Amer et al. (2011)	FhNADI-H2
	China	AB477357	Peng et al. (2009)	FhNADI-H2
	Uruguay	AB207154	Itagaki et al. (2005)	FhNADI-H2
	Iran	GQ356033	Moazeni et al. (2012)	FhNADI-H2

Algeria Tlemcen, Ain- Temouchent	MK212139	Present study	FhNADI-H3
Algeria Ain- Temouchent	MK212140	Present study	FhNADI-H4
Algeria Batna	MK212141	Present study	FhNADI-H5
Egypt	LC076240, 85	Amer et al. (2016)	
Egypt	AB554178, 79, 82, 83, 87	Amer et al. (2011)	
Italy	JF8246779	Farjallah et al. (2013)	
Ireland	AB207156	Itagaki et al. (2005)	
Poland	KR422393	Januszkiewicz et al. (2015)	
Brazil	MF287675	Labruna et al. 2018	
Japan	LC012035	Ichikawa-Seki et al. (2017)	
China	AB477357, 58	Peng et al. (2009)	
Spain	KF111630, 64, 67, 7474	Martínez-Valladares and Rojo- Vázquez (2014)	
Peru	LC070669	Ichikawa-Seki et al. (2016)	

---

**Tableau XXXI** : Testes de neutralité de Tajima's D et Fu's FS

	<b>Fu's FS (p-value)</b>	<b>Tajima's D (p-value)</b>
<b>COI-trnT-rrnL</b>	-0.505 (0.038)	-0.207(0.046)
<b>COI</b>	-5.737 (0.002)	-1.268 (0.005)
<b>NDI</b>	-1.031 (0.037)	-1.150 (0.043)



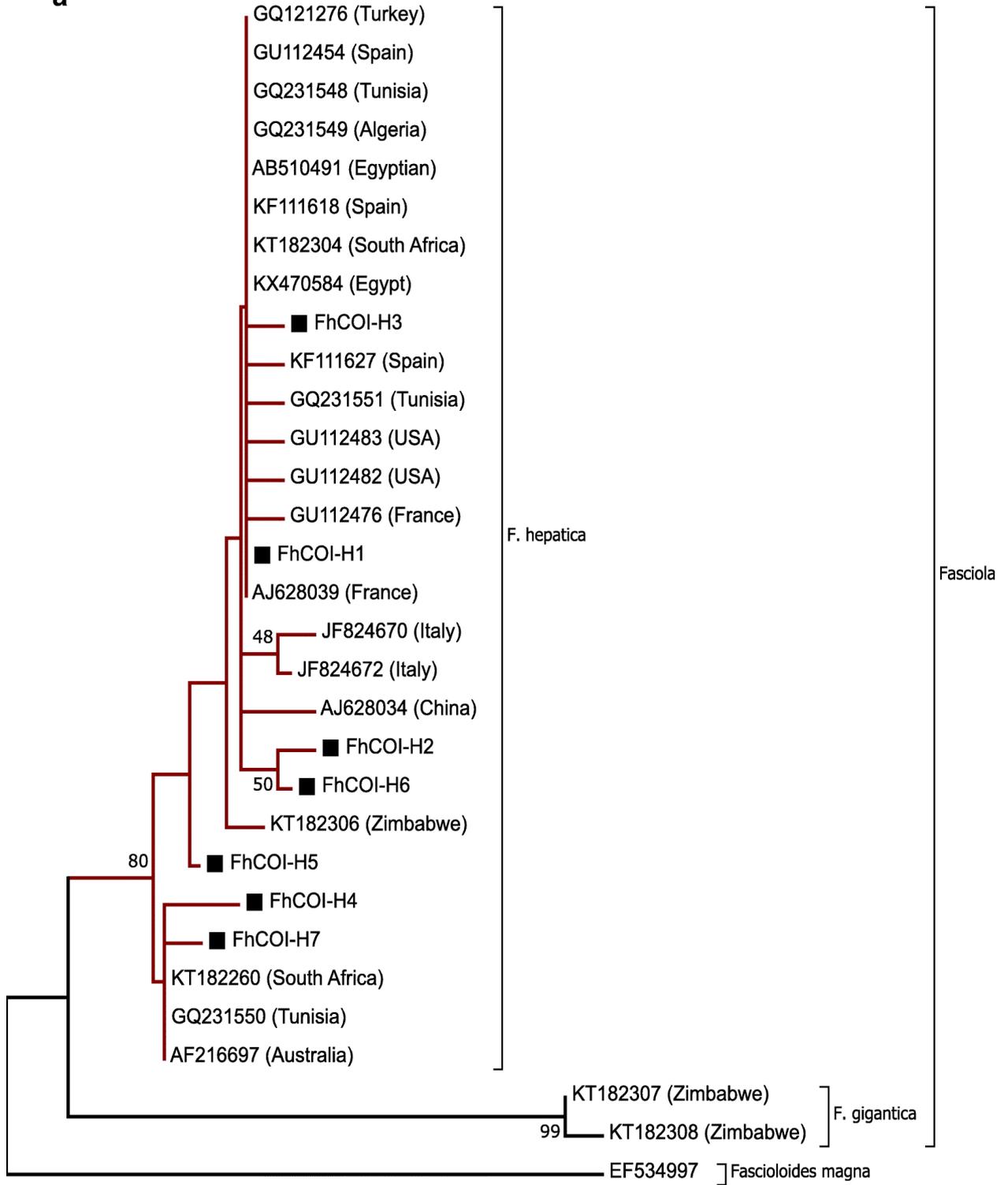
**Figure 75:** Mismatch Distribution pour tester l'expansion des isolats de *F. hepatica*. Le nombre de différences de nucléotides entre les paires de séquences est indiqué en abscisse et leur fréquence en ordonnée. COI-trnT-rrnL (a), COI (b) et NADI (c)

Les deux analyses phylogénétiques ont montré des topologies similaires pour COI, NADI et COI-trnT-rrnL. Seuls les arbres ML sont représentés (Figure 76 a– c). (les Nj sont en Annexe 6)

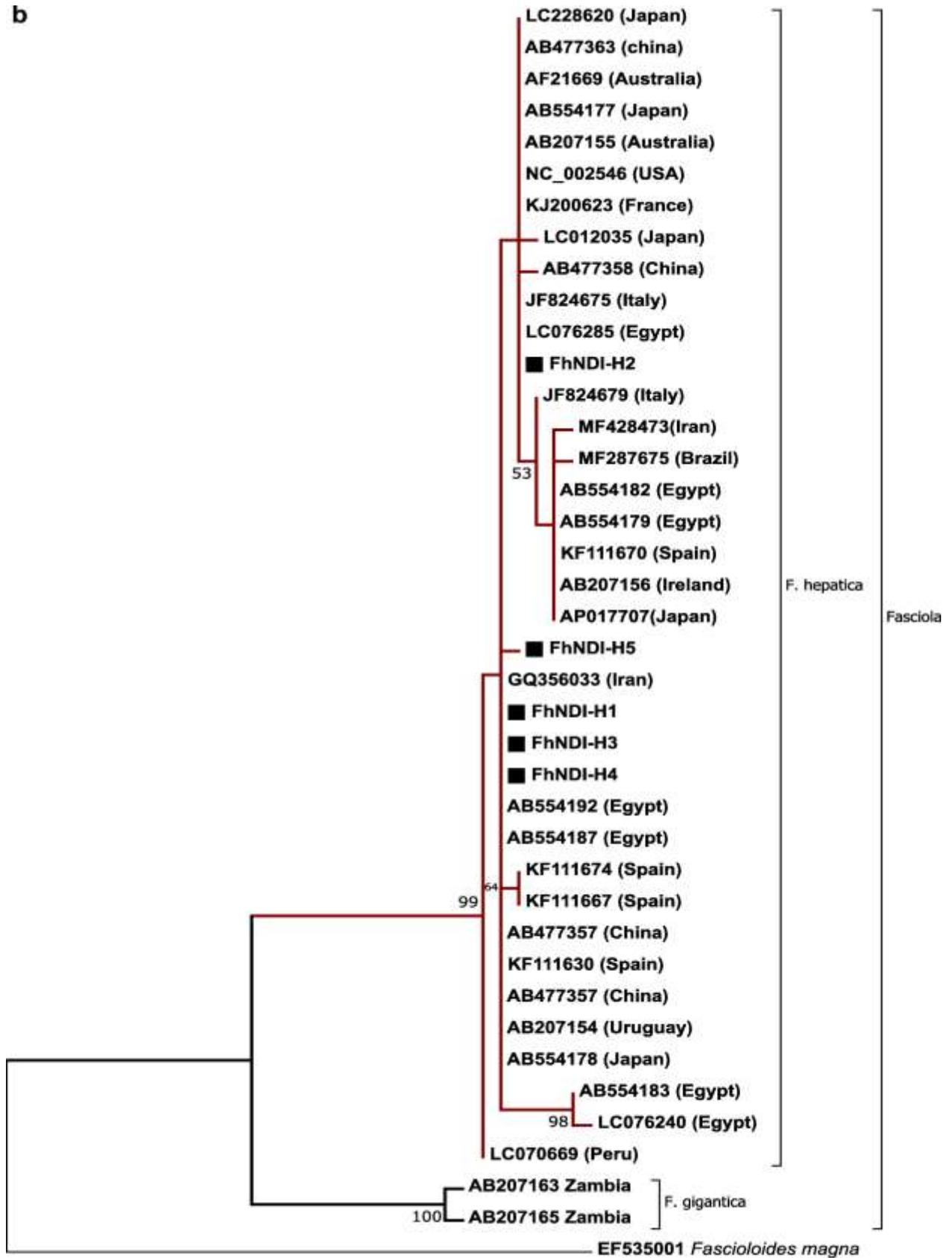
Les valeurs de prise en charge des nœuds dans le texte consistent en des valeurs bootstrap ML. Deux groupes frères bien soutenus correspondant à *F. hepatica* et *F. gigantea* ont été observés.

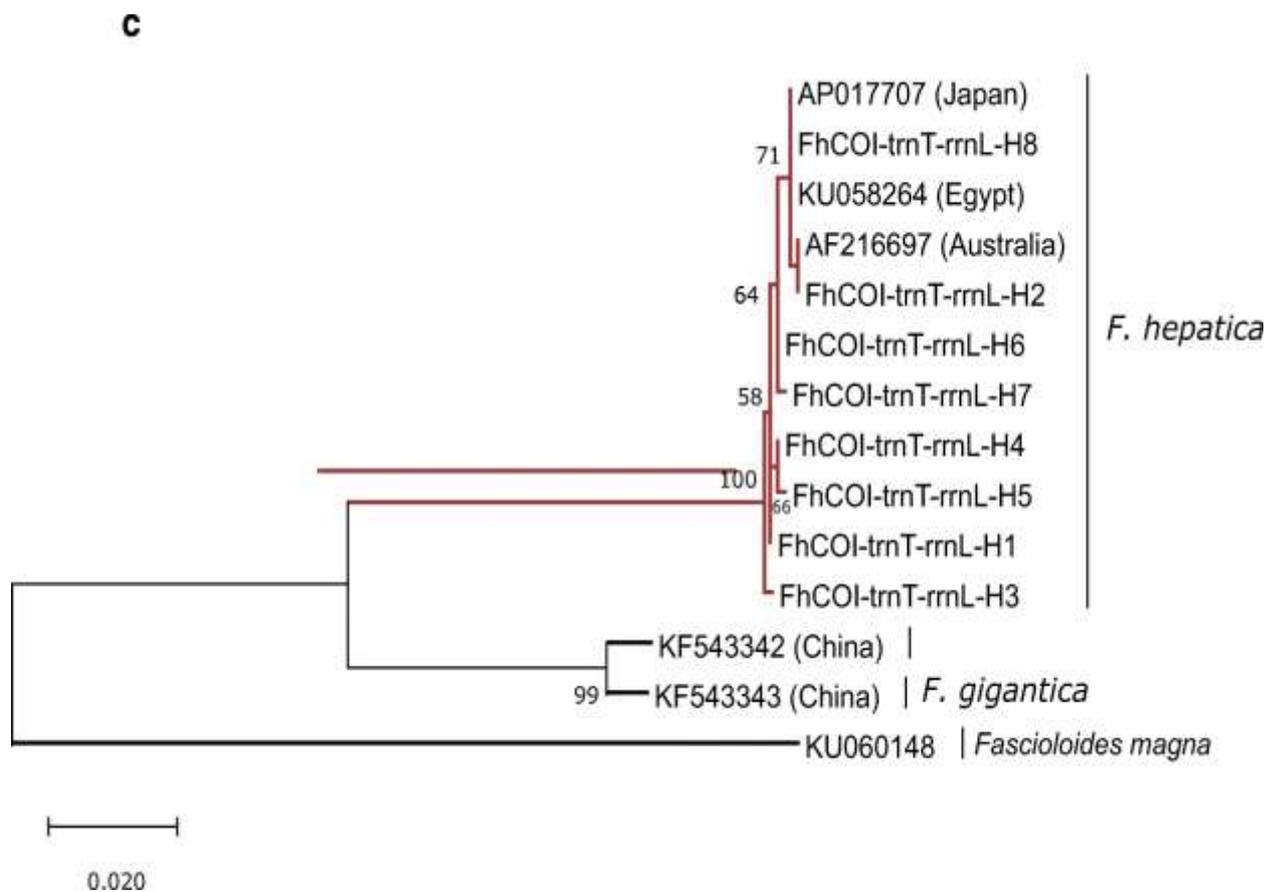
Les douves algériennes appartenaient à un groupe monophylétique comprenant tous les *F. hepatica*. Dans les arbres NJ (Annexe 6 a – c) et ML, les valeurs bootstrap pour ce clade étaient supérieures à 80% pour le COI et à 99% pour le COI-trnT-rrnL et le NADI. Dans le clade *F. hepatica*, tous les nœuds étaient faiblement soutenus.

a



**b**





**Figure 76:** Arbres de consensus construits avec la méthode ML montrant les relations phylogénétiques entre *F. hepatica* et *F. gigantea*. Phylogénie déduite des séquences COI (a), NADI (b) et COI-trnT-rrnL (c). Les nombres affichés aux nœuds des branches sont des valeurs bootstrap. *Fascioloides magna* (COI, NADI et COI-trnT-rrnL) a été utilisé comme groupe externe

### III. Étude des facteurs de risques de la distomatose hépatique à *Fasciola hepatica*

Pour l'étude des différents facteurs de risque de la fasciolose chez les bovins notre étude statistique a été réalisée sur la totalité des bovins abattus au niveau des trois wilayas à savoir Tizi-ouzou, Bouira, Béjaia soit 4700 bovins en prenant en considération leurs positivité à partir des quatre techniques de diagnostique (inspection des foies, coprologie, analyse de la bile et enfin la sérologie par ELISA).

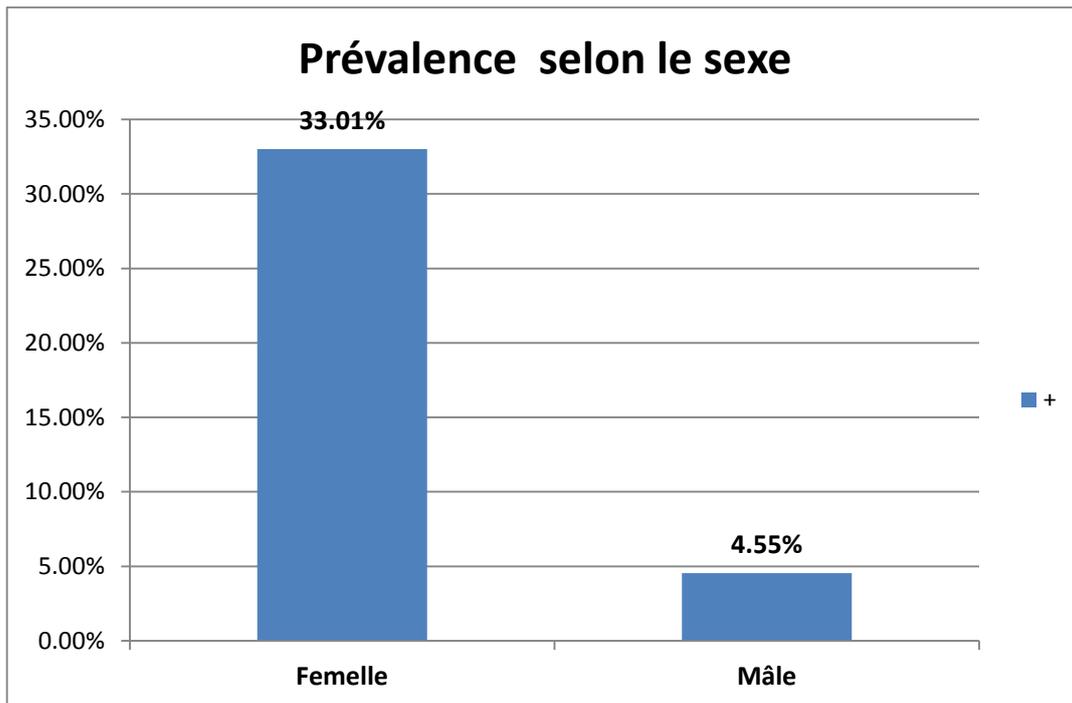
#### III.1.Facteur sexe :

L'analyse des 4700 prélèvements de bovins provenant des trois wilayas du nord de l'Algérie à savoir l'inspection des foies, l'analyse de la bile, la coprologie et la sérologie à révélé que sur les 389 bovins positifs à la fasciolose, 203(33.01%) étaient des femelles sur un total de seulement 615 femelles de l'ensemble de l'échantillon analysé, contre seulement 186 (4.55%) de bovins mâles positifs à la fasciolose sur un total de 4085 mâles de l'ensemble de l'échantillon analysé. Ainsi notre étude statistique a révélé une association significative entre l'atteinte fasciolienne et le sexe de l'animal ( $P < 0.05$ ). (Tableau XXXII)(Figure 77).

**Tableau XXXII:** Tableau représentant l'atteinte fasciolienne selon le sexe de l'animal

	<b>Femelle</b>	<b>Mâle</b>	<b>Total</b>
+	203(33.01%)	186(4.55%)	389(8.277%)
-	412(66.99%)	3899(95.45%)	4311(91.723%)
<b>Total</b>	<b>615(100.0%)</b>	<b>4085(100.0%)</b>	<b>4700(100.0%)</b>

<b>Test Statistique</b>	<b>Value</b>	<b>df</b>	<b>p-value</b>
<b>Pearson Chi-square</b>	570.100	1.000	0.000



**Figure 77:** Histogramme représentant l'atteinte fasciolienne selon le sexe de l'animal

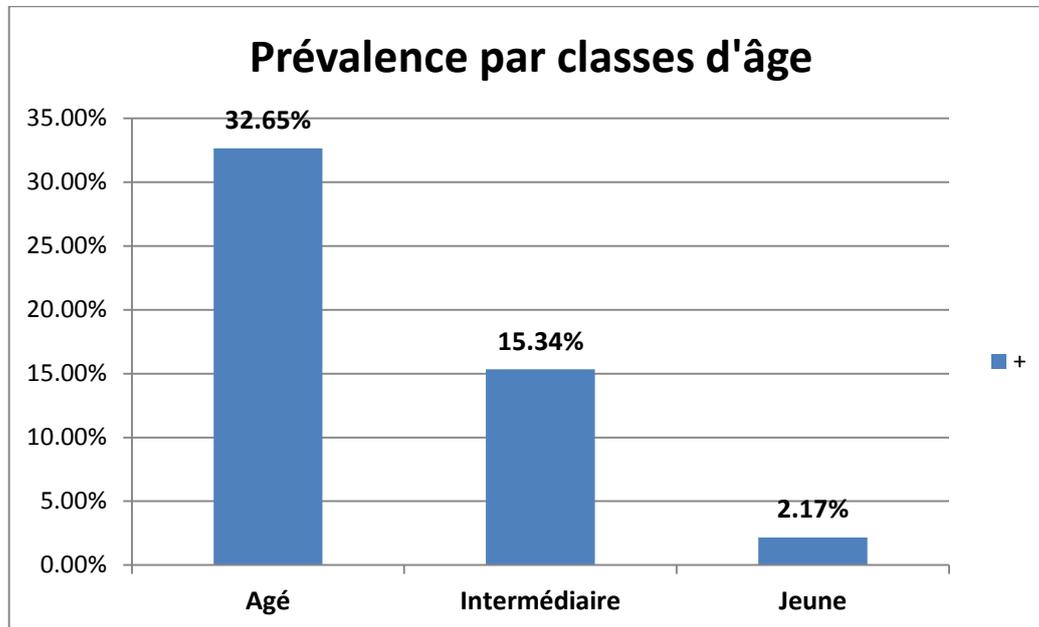
### III.2.Facteur âge :

Nos animaux prélevés ont été classés en trois catégories d'âge à savoir âgé (>4ans), Intermédiaire (2-4ans) et Jeune (<2ans), sur les 389 bovins révélés positifs à la fasciolose, 128 (32.65%) étaient âgés sur un total de 392 bovins âgés ; 195(15.34%) étaient des bovins d'un âge intermédiaire, et seulement 66 (2.17%) étaient des bovins jeunes. Notre étude statistique a révélé l'existence d'une association significative entre l'atteinte fasciolienne et la classe d'âge des animaux ( $p < 0.001$ ), ainsi les animaux d'un âge avancé semble être plus susceptible d'être atteints de la fasciolose (Tableau XXXIII) , (Figure 78).

**Tableau XXXIII:** Tableau représentant l'atteinte fasciolienne selon la classe d'âge des animaux

	Agé	Intermédiaire	Jeune	Total
+	128(32.65%)	195(15.34%)	66(2.17%)	389(8.277%)
-	264(67.35%)	1076(84.66)	2971(97.83%)	4311(91.723%)
Total	<b>392(100.0%)</b>	<b>1271(100.0%)</b>	<b>3037(100.0%)</b>	<b>4700(100.0%)</b>

Test Statistique	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	539.436	2.000	0.000



**Figure 78:** Histogramme représentant l'atteinte fasciolienne selon la classe d'âge des animaux

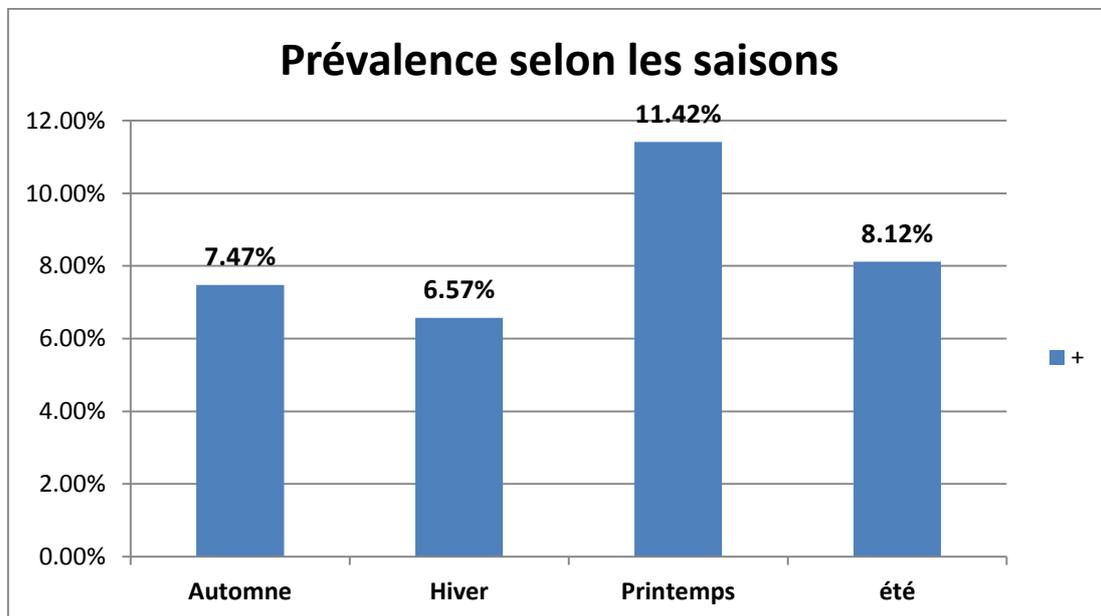
### III.3.Facteur saison

Notre étude a été réalisée durant les quatre saisons de l'année, les résultats obtenus ont montré que sur les 389 bovins positifs la plus grande prévalence était enregistrée durant la saison du Printemps avec 117 (11.42%) bovins positifs, suivie de celle de l'été avec 80 (8.12%) de bovins positifs, l'Automne avec 126 (7.47%); et enfin en dernière position la saison de l'Hiver avec seulement 66 (6.57%) de bovins positifs. Notre étude statistique a également révélé la présence d'une association significative entre l'atteinte fasciolienne et la saison de l'année ( $p < 0.001$ ). (TableauXXXIV)(Figure 79).

**TableauXXXIV** : Tableau représentant l'atteinte fasciolienne selon la saison de l'année

	Automne	Hiver	Printemps	été	Total
<b>+</b>	126(7.47%)	66(6.57%)	117(11.42%)	80(8.12%)	389(8.277%)
<b>-</b>	1560(92.53%)	938(93.43%)	908(88.58%)	905(91.88%)	4311(91.723%)
<b>Total</b>	<b>1686(100.0%)</b>	<b>1004(100.0%)</b>	<b>1025(100.0%)</b>	<b>985(100.0%)</b>	<b>4700(100.0%)</b>

Test Statistique	Value	df	p-value
Pearson Chi-square	18.595	3.000	0.000



**Figure 79:** Histogramme représentant l'atteinte fasciolienne selon la saison de l'année

#### III.4.Facteur race :

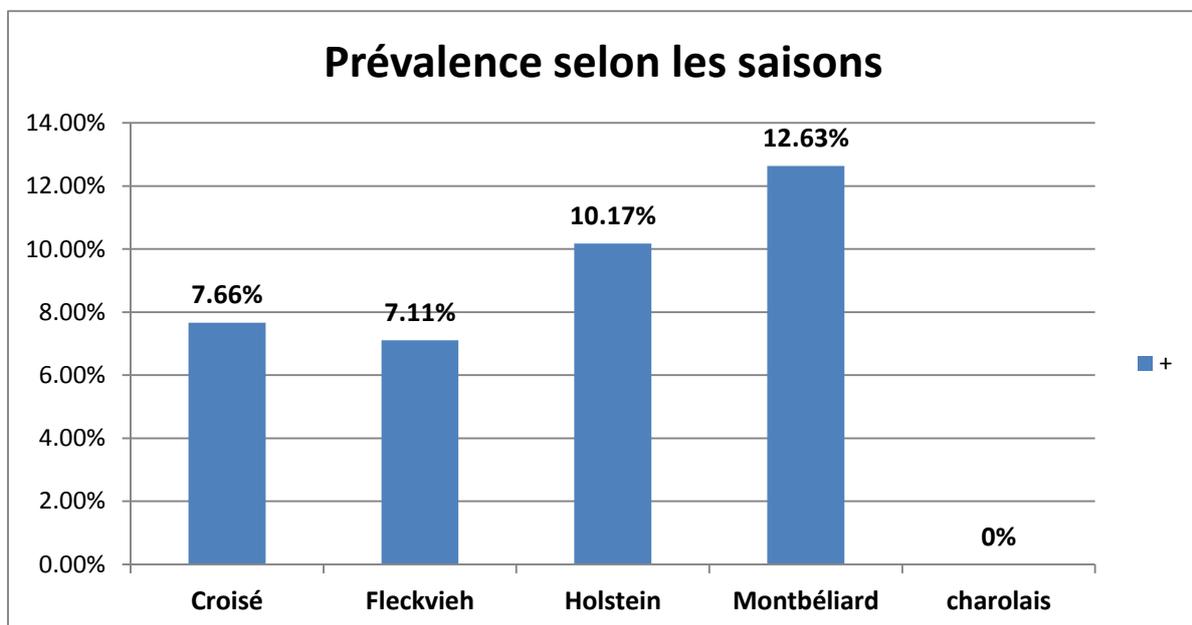
La détermination de la race des animaux prélevés se faisait au niveau des abattoirs à partir des fiches d'orientation vers l'abattage de chaque bovin signé par le vétérinaire suivant le cheptel ,sur les 389 bovins positifs, les races montrant le taux d'infestation le plus élevé étaient dans un premier lieu la race Montbéliarde avec 135(12.63%) de bovins positifs, suivie de la race Holstein avec 106(10.17%) bovins positifs ,suivie de la race Croisé avec 93(7.66%) de bovins positifs, suivie de la race Fleckvieh avec

seulement 55 (7.11%) bovins positifs ,et enfin la race charolaise qui n'a présenté aucun cas de fasciolose soit 0% ,notre étude statistique a révélé l'existence d'une association significative entre l'atteinte fasciolienne et la race de l'animal ( $p < 0.001$ ). (Tableau XXXV),(Figure 80).

**Tableau XXXV:** Tableau représentant l'atteinte fasciolienne selon la race de l'animal

	Croisé	Fleckvieh	Holstein	Montbéliard	charolais	Total
<b>+</b>	93 (7.66%)	55 (7.11%)	106 (10.17%)	135 (12.63%)	0 (0.000%)	389 (8.277%)
<b>-</b>	1121 (92.34%)	719 (92.89%)	936 (89.83%)	934 (87.37%)	601 (100%)	4311 (91.723%)
<b>Total</b>	<b>1214</b> <b>(100.0%)</b>	<b>774</b> <b>(100.0%)</b>	<b>1042</b> <b>(100.0%)</b>	<b>1069</b> <b>(100.0%)</b>	<b>601</b> <b>(100.0%)</b>	<b>4700</b> <b>(100.0%)</b>

Test Statistique	Value	df	p-value
<b>Pearson Chi-square</b>	87.840	4.000	0.000



**Figure 80:** Histogramme représentant l'atteinte fasciolienne selon la race de l'animal

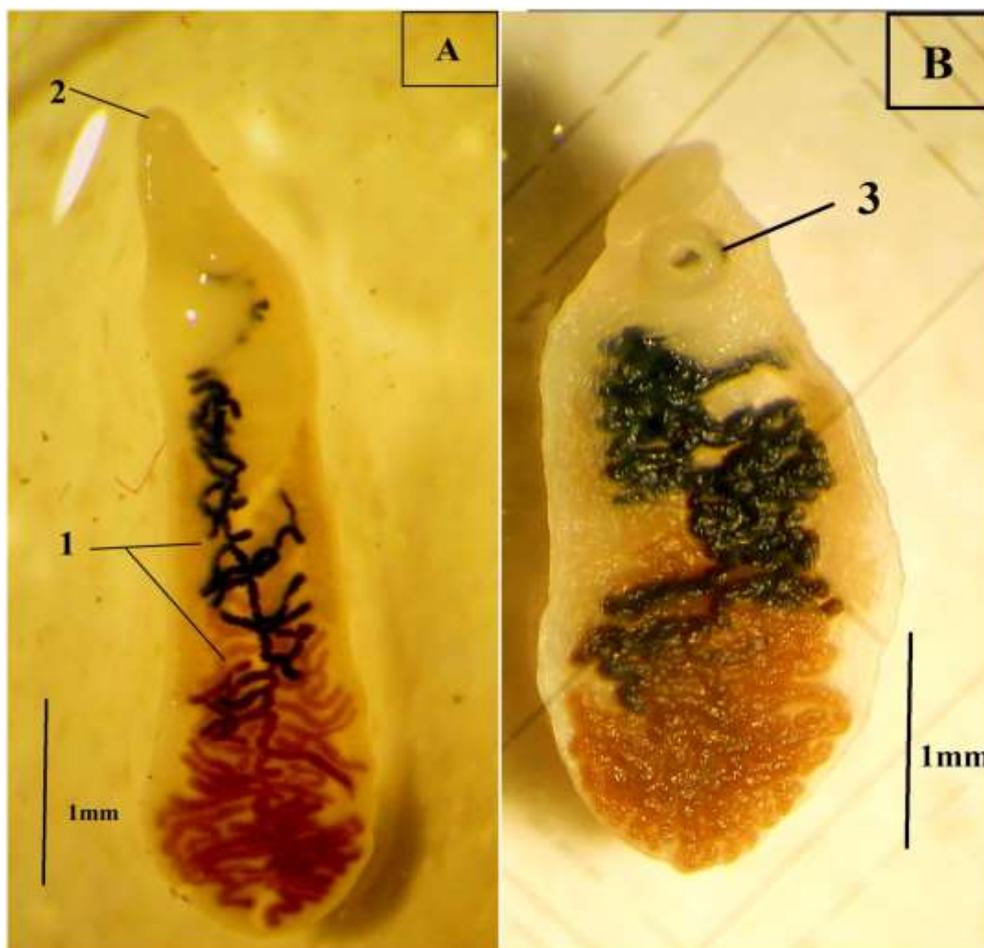
## Partie II : Résultats de la dicrocélie

### I. Prévalence totale de la dicrocélie

Lors de l'inspection des 4700 foies, 21 (0,44%) présentaient une cholangite distomienne (inflammation des voies biliaires avec présence du parasite *D. dendriticum*) (Figure 81 ) (Tableaux XXXVI et XXXVII).

**TableauXXXVI:** La prévalence totale de la dicrocélie au niveau des trois wilayas

+ (positif)	- (négatifs)	Total
21(0.447%)	4679(99.553%)	4700(100.000%)



**Figure 81:** Adulte de *Dicrocoelium dendriticum* observé sous la loupe (1: Utérus , 2: ventouse buccale , 3: ventouse ventrale) avec un corps translucide (photo Chougar L., 2017)

**Tableau XXXVII:Résumé des 21 bovins positifs à la dicrocélie.**

Number	Saison	Race	Age	Sexe	Dicrocélie	Analyses			Origine
						foie	Bile	feces	
398	Hiver	Montbéliard	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	-	Tizi-O
523	printemps	Holstein	Inter.	Female	+	Chol+dist+	+	+	Tizi-O
609	Printemps	Montbéliard	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	+	Tizi-O
614	printemps	Montbéliard	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	+	Tizi-O
641	printemps	Croisée	Jeune	Female	+	Chol+dist+	+	-	Tizi-O
838	Printemps	Montbéliard	Inter.	Female	+	Chol+dist+	+	+	Tizi-O
862	Été	Croisée	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	-	Tizi-O
1015	Été	Croisée	Jeune	Male	+	Chol+dist+	+	-	Tizi-O
1182	Été	Montbéliard	Inter.	Male	+	Chol+dist+	+	+	Tizi-O
1309	Automne	Montbéliard	Inter.	Male	+	Chol+dist+	+	-	Tizi-O
1369	Automne	Montbéliard	Inter.	Female	+	Chol+dist+	+	-	Tizi-O
2027	Printemps	Fleckvieh	Inter.	Male	+	Chol+dist+	+	+	Bouira
2224	Printemps	Croisée	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	-	Bouira
2312	Printemps	Montbéliard	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	+	Bouira
2401	Été	Montbéliard	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	-	Bouira
2448	Été	Fleckvieh	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	-	Bouira
2649	Automne	Montbéliard	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	+	Bouira
2774	Automne	Croisée	Inter.	Male	+	Chol+dist+	+	-	Bouira
3450	Printemps	Fleckvieh	Inter.	Female	+	Chol+dist+	+	+	Bejaïa
3693	Été	Montbéliard	Inter.	Male	+	Chol+dist+	+	-	Bejaïa
3794	Automne	Montbéliard	Agé	Female	+	Chol+dist+	+	+	Bejaïa

<sup>a</sup> Chol + dist +: cholangite distomienne (inflammation des canaux biliaires avec présence du parasite); <sup>b</sup> Chol + dist -: cholangite non distomienne (inflammation des canaux biliaires sans présence du parasite), <sup>c</sup> (+): présence d'œuf de *D. dentriticum*, <sup>d</sup> (-): absence d'œuf de *D. dentriticum*, <sup>e</sup> inter. : Intermediaire (2-4 years), <sup>f</sup>Agé:> 4years, <sup>g</sup>Jeune : <2years ,Tizi-O :Tizi-Ouzou

### I.1.Résultats de l'inspection des foies au niveau des abattoirs :

L'inspection des 4700 foies de bovins au niveau des abattoirs des trois wilayas nous a permis d'observer une inflammation des canalicules biliaires avec présence du parasite *D.dendriticum* décrit ici pour la première fois en Algérie chez 21 bovins soit une prévalence de 0.45% , et 623 bovins quant à eux présentaient une inflammation des canalicules biliaires avec absence du parasite soit une prévalence de 13.25%. (Tableau XXXVIII).

**Tableau XXXVIII:** Résultats de l'inspection des foies au niveau des abattoirs

	<b>Chol+dist+</b>	<b>Chol+dist-</b>	<b>Sain</b>	<b>Total</b>
<b>Bouira</b>	7(0.149%)	130(2.766%)	1167(24.830%)	1304(27.745%)
<b>Béjaia</b>	3(0.064%)	181(3.851%)	1554(33.064%)	1738(36.979%)
<b>Tizi-Ouzou</b>	11(0.234%)	312(6.638%)	1335(28.404%)	1658(35.277%)
<b>Total</b>	<b>21(0.447%)</b>	<b>623(13.255%)</b>	<b>4056(86.298%)</b>	<b>4700(100.0%)</b>

<sup>a</sup> Chol + dist +: cholangite distomienne (inflammation des canaux biliaires avec présence du parasite); <sup>b</sup> Chol + dist -: cholangite non distomienne (inflammation des canaux biliaires sans présence du parasite)

### I.2.Résultats de l'analyse de la bile :

L'analyse de la bile des 4700 échantillons prélevés a révélé la présence d'œufs du parasite chez 21 bovins soit une prévalence de 0.45% contre 99.53% présentant aucun œuf du parasite. (Tableau XXXIX).

**Table XXXIX:** Résultats de l'analyse de la bile

	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>Total</b>
<b>Bouira</b>	7(0.149%)	1297(27.596%)	1304(27.745%)
<b>Béjaia</b>	3(0.064%)	1735(36.915%)	1738(36.979%)
<b>Tizi-Ouzou</b>	11(0.234%)	1647(35.043%)	1658(35.277%)
<b>Total</b>	<b>21(0.447%)</b>	<b>4679(99.553%)</b>	<b>4700(100.0%)</b>

<sup>a</sup> (+): présence d'œuf de *D. dendriticum*, <sup>d</sup> (-): absence d'œuf de *D. dendriticum*

### I.3. Résultats de l'analyse coprologique :

Sur les 4700 prélèvements de matières fécales, 10 bovins seulement ont révélé la présence d'œufs de *D. dendriticum* soit une prévalence de 0.21% contre 99.78% présentant une absence d'œufs du parasite. (Tableau XXXX).

**Table XXXX:** Résultats de l'analyse coprologique

	+	-	Total
<b>Bouira</b>	3(0.064%)	1301(27.681%)	1304(27.745%)
<b>Béjaia</b>	2(0.043%)	1736(36.936%)	1738(36.979%)
<b>Tizi-Ouzou</b>	5(0.106%)	1653(35.170%)	1658(35.277%)
<b>Total</b>	<b>10(0.213%)</b>	<b>4690(99.787%)</b>	<b>4700(100.0%)</b>

<sup>a</sup> (+): présence d'œuf de *D. dendriticum*, <sup>d</sup> (-): absence d'œuf de *D. dendriticum*

## II. Prévalence de la dicrocélie bovine au niveau des différentes wilayates :

### II.1. wilaya de Tizi-Ouzou

1658 bovins de la wilaya de Tizi-Ouzou faisaient partie de notre étude dans laquelle 11 (0,66%) étaient positifs pour la dicrocélie avec la présence du parasite et des œufs, comme indiqué dans les tableaux XXXVII et XXXXI.

**Tableau XXXXI:** Résultats de l'inspection des foies, analyse de la bile et la coprologie (Tizi-Ouzou)

Tizi-Ouzou	Analyse de la bile		Analyse coprologique		Inspection des foies		
	+	-	+	-	Chol+dist+	Chol+dist-	sain
	11 (0.66%)	1647 (99.3%)	5 (0.3%)	1653 (99.7%)	11 0.66%	312 (18.8%)	1335 (80.5%)
<b>Total</b>	<b>1658</b> <b>(100%)</b>		<b>1658</b> <b>(100%)</b>			<b>1658</b> <b>(100%)</b>	

### II.2. Wilaya de Bouira

Les tableaux XXXVII et XXXXII montrent que parmi les 1 304 bovins inspectés et analysés, seuls 7 bovins (0,54%) étaient positifs pour la dicrocélie avec la présence du parasite et des œufs.

**Tableau XXXXII:** Résultats de l'inspection des foies, analyse de la bile et la coprologie (Bouira)

Bouira	Analyse de la bile		analyse coprologique		Inspection des foies		
	+	-	+	-	Chol+dist+	Chol+dist-	Sain
	7	1297	3	1301	7	130	1167
	0.54%)	(99.4%)	0.23%)	(99.7%)	(0.54%)	(9.96%)	(89.5%)
<b>Total</b>	<b>1304</b>		<b>1304</b>		<b>1304</b>		
	<b>(100%)</b>		<b>(100%)</b>		<b>(100%)</b>		

### II.3. wilaya de Bejaia

Parmi les 1 738 bovins inspectés et analysés, seuls 3 bovins (0,17%) étaient positifs pour la dicrocoeliose avec présence d'œufs et d'adultes du parasite, comme présenté dans les (Tableaux XXXXIII).

**Tableau XXXXIII:** Résultats de l'inspection des foies, analyse de la bile et la coprologie (Bejaia)

Béjaia	Analyse de la bile		analyse coprologique		Inspection des foies		
	+	-	+	-	Chol+dist+	Chol+dist-	sain
	3	1735	2	1736	3	181	1554
	(0.17%)	(99.82%)	(0.11%)	(99.88%)	(0.17%)	(10.4%)	(89.4%)
<b>Total</b>	<b>1738</b>		<b>1738</b>		<b>1738</b>		
	<b>(100%)</b>		<b>(100%)</b>		<b>(100%)</b>		

### III. Facteurs de risque

Les facteurs de risque étant les mêmes pour les trois wilayates (Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaia), l'ensemble du cheptel bovin des trois wilayates a été sélectionné pour l'étude statistique.

#### III.1. Facteur de saison

Parmi les 0,45% de cas positifs, 6(0.61%) étaient en été, 5(0.29%) en automne et 9(0.87%) au printemps, par rapport à une prévalence de 1(0.09%) en hiver. Une faible association significative entre la positivité de *Dicrocoelium dentriticum* et la saison a été observée ( $p=0,038$ ), comme le montre le (Tableau XXXXIV).

**Tableau XXXXIV:** positivité des bovins selon le facteur saison

infection	Automne	Hiver	Printemps	été	Total
+	5(0.29%)	1(0.09%)	9(0.87%)	6(0.61%)	21(0.45%)
-	1681 (99.7%)	1003 (99.9%)	1016 (99.12%)	979 (99.39%)	4679 (99.553%)
Total	<b>1686</b> <b>(100.0%)</b>	<b>1004</b> <b>(100.0%)</b>	<b>1025</b> <b>(100.0%)</b>	<b>985</b> <b>(100.0%)</b>	<b>4700</b> <b>(100.0%)</b>
<sup>a</sup> <i>p</i> =0.038					

### III.2. Facteur âge

Sur les 0,45% des cas positifs, 10(2.55%) étaient âgés (> 4 ans), 9(0.71%) étaient d'âge moyen (2 à 4 ans) et 2(0.06%) étaient jeunes (<2 ans). Il existe une association significative entre la positivité de l'animal au *Dicrocoelium dentriticum* et la classe d'âge de l'animal ( $p < 0,001$ ), comme indiqué dans le (Tableau XXXXV).

**Tableau XXXXV:** Positivité des bovins selon le facteur âge

Infection	Agé	Intermédiaire	Jeune	Total
+	10(2.55%)	9(0.71%)	2(0.06%)	21(0.447%)
-	382(97.45%)	1262(99.29%)	3035(99.94%)	4679(99.553%)
Total	<b>392((100.0%))</b>	<b>1271((100.0%))</b>	<b>3037((100.0%))</b>	<b>4700(100.0%)</b>
<sup>a</sup> <i>p</i> =0.000				

### II.3. Facteur sexe

Sur les 0,45% de cas positifs, 15(2.44%) étaient des femelles et 6(0.15%) étaient des mâles. Notre étude statistique a révélé l'existence d'une différence significative selon le sexe de l'animal (mâle ou femelle) pour *Dicrocoelium dentriticum* ( $p < 0,001$ ), comme indiqué dans le (Tableau XXXXVI).

**Tableau XXXXVI:** positivité des bovins selon le facteur sexe

Infection	Femelle	Mâle	Total
+	15(2.44%)	6(0.15%)	21(0.447%)
-	600(97.56%)	4079(99.85%)	4679(99.553%)
Total	<b>615(100.0%)</b>	<b>4085(100.0%)</b>	<b>4700(100.0%)</b>
<sup>a</sup> <i>p</i> =0.000			

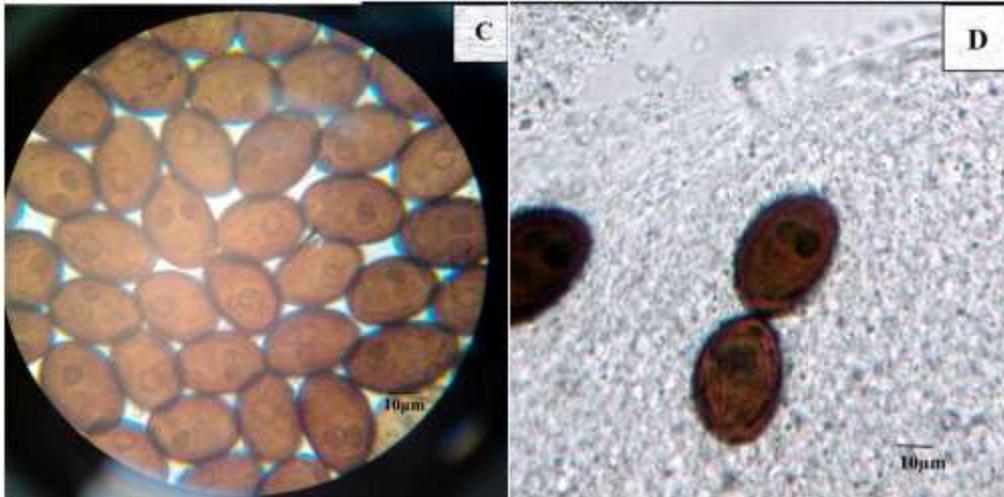
#### IV. Résultats de l'analyse morphologiques

Le tableau (XXXXVII) présente les résultats des mesures morphologiques. Le corps des douves est aplati, lancéolé translucide, plus étroit dans la région antérieure que dans la région postérieure. La longueur moyenne du corps était de 3,69 mm et la largeur moyenne maximale était de 1 mm au niveau des glandes vitellines ou de la partie postérieure du corps. Son tégument est lisse, comme le montre la (Figure 81).

**Table XXXXVII:** données Morphométriques du *Dicrocoelium dendriticum*

Corps/Organes	Items	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	
		Minimum-maximum	Moyenne
<b>corps</b>	Longueur	2.6mm–4.6 mm	3.69mm
	Largeur	1-1.2mm	1mm
<b>Ventouse buccale</b>	Diamètre interne	90-111µm	103.66µm
	Externe	245-285µm	271.76µm
<b>Ventouse ventrale</b>	Diamètre interne	102-120µm	113.19µm
	Externe	312-366µm	344µm
<b>Testicules</b>	Longueur	250-300µm	272.14µm
	Largeur	480-580µm	537.42µm
<b>Ovaire</b>	Longueur	90-115µm	107µm
	Largeur	180-285µm	230µm
<b>Glande vitellogène</b>	Length	855-1500µm	1107.71µm
<b>Oeuf dans l'uterus</b>	Longueur	31.6-38.8µm	34.19µm
	Largeur	20.8-25.6µm	22.44µm
<b>Poche de cirre</b>	Longueur	420-450µm	439µm
	Largeur	120-140µm	135.04µm
<b>Ootype</b>	Longueur	60.2-67.9µm	65.5µm
	Largeur	102-111µm	105.9µm

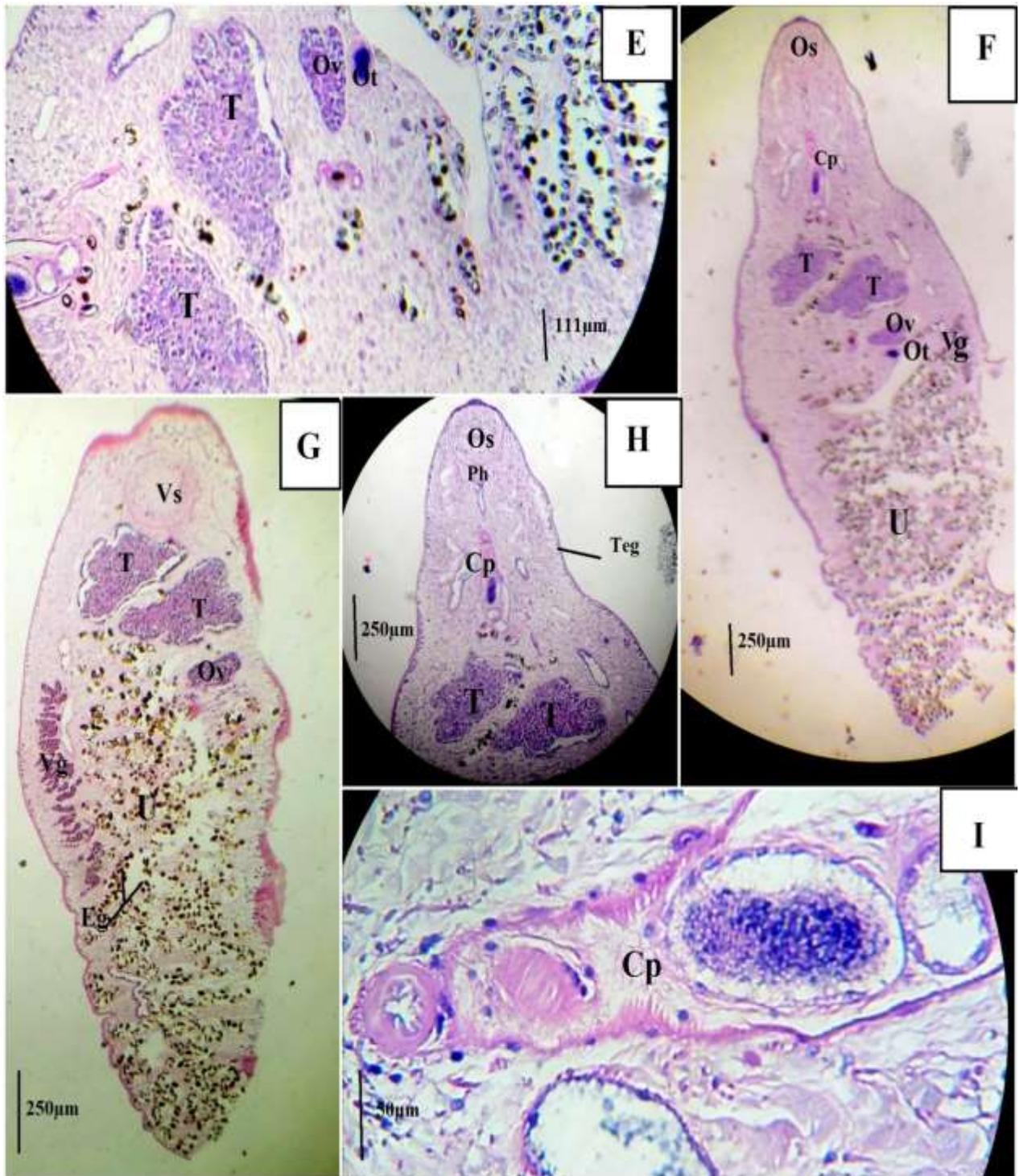
La ventouse buccale était ronde et située à l'extrémité antérieure du corps. Le diamètre externe moyen de la ventouse buccale était de 271  $\mu\text{m}$ . Sous la ventouse buccale, un petit pharynx rond (60  $\mu\text{m}$ ) suivi d'un œsophage fin ont été observés. La ventouse ventrale était ronde et le diamètre extérieur moyen était de 344  $\mu\text{m}$ , comme le montre la (Figure 83).



**Figure 82:** Nombreux œufs de *Dicrocoelium dentriticum* dans la bile (C) et les matières fécales (D) observés au microscope optique (Gr. X 1000)

Les deux testicules globulaires sont situés immédiatement après la ventouse ventrale. Ils sont disposés dans une orientation tandem légèrement oblique, leur taille varie de (250 à 300  $\mu\text{m}$ ) pour la longueur et (480 à 580  $\mu\text{m}$ ) pour la largeur. La posture de la poche de Cirre est volumineuse et axiale allongée (420 à 450  $\mu\text{m}$ ). La Figure 83 montre également qu'un petit ovaire est situé directement derrière le testicule droit et que l'ootype (60,2-67,9  $\mu\text{m}$ ) de longueur est situé au dessous de l'ovaire. (Tableau XXXXVII)

Les glandes vitellines (855-1500  $\mu\text{m}$ ) occupent 1/3 du corps du parasite en position centrale et n'atteignent pas le bord postérieur de l'ovaire. L'utérus occupe les 2/3 postérieurs du corps du *Dicrocoelium* caractérisé par de nombreuses convolutions. Les œufs sont ellipsoïdaux, légèrement asymétriques et mesurent de 31,6 à 38,8  $\mu\text{m}$  de long et de 20,8-25,6  $\mu\text{m}$  de large ; mature dans la partie antérieure avec un petit opercule sur un pôle et deux vésicules plus claires entourant le pôle opposé, comme illustré à la (Figure 83).



**Figure 83:** Coupe histologique d'un adulte de *Dicrocoelium dentriticum* (Cp: poche de Cirre, Os: ventouse buccale, Vs: ventouse ventrale, T: testicules, Ov: ovaire, Ot: Ootype, Ph: pharynx, U: utérus rempli d'œufs bruns du parasite ,Teg: Son tégument est lisse.

**Partie III- co-infection et réaction croisée entre *Fasciola hepatica* et le  
*Dicrocoelium dendriticum***

**I. Prévalence de la co-infection entre *Fasciola hepatica* et le *Dicrocoelium dendriticum***

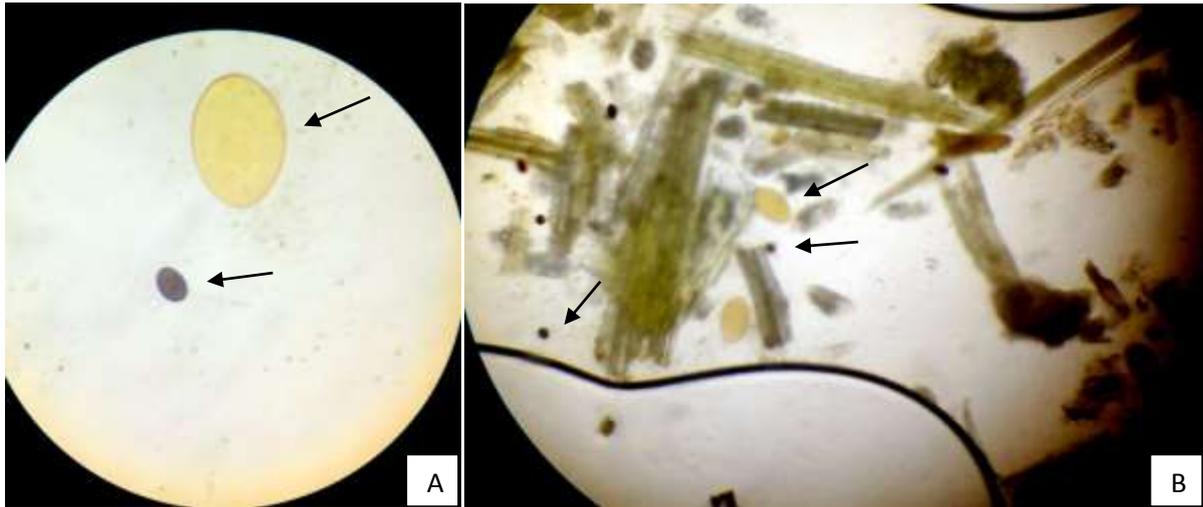
Notre étude nous a permis non seulement de déterminer pour la première fois la présence du *Dicrocoelium dendriticum* dans quelques abattoirs du nord de l'Algérie mais aussi la présence de co-infections entre ce dernier et *Fasciola hepatica*, en effet sur un total de 4700 bovins inspectés, 6 ont révélé une co-infection à ces deux parasites et cela avec la présence des deux parasites au niveau de l'inspection des foies, et présence des œufs dans la bile et les matières fécales, soit une prévalence de **0.13%**. Toutes étaient des femelles d'un âge avancé provenant de la wilaya de Tizi-Ouzou et Béjaia. (Tableau XXXXVIII) (Tableau XXXXIX), (Figure 84).

**Tableau XXXXVIII:** Tableau représentatif de la co-infection par *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum*

	+ ( <i>Dicrocoelium</i> )	-( <i>Dicrocoelium</i> )	Total
+ ( <i>Fasciola</i> )	6(0.128%)	383(8.149%)	389(8.277%)
- ( <i>Fasciola</i> )	15(0.319%)	4296(91.404%)	4311(91.723%)
<b>Total</b>	<b>21(0.447%)</b>	<b>4679(99.553%)</b>	<b>4700(100.0%)</b>

**Tableau XXXXIX:** Tableau représentatif des 6 bovins co-infectés par la fasciolose et la dicrocoélie.

numéro	saison	race	âge	sexe	Total Fasciola	Total Dicro	wilaya
<b>523</b>	Printemps	Holstein	Intermédiaire	Femelle	+	+	Tizi-Ouzou
<b>609</b>	Printemps	Montbéliard	Agé	Femelle	+	+	Tizi-Ouzou
<b>614</b>	Printemps	Montbéliard	Agé	Femelle	+	+	Tizi-Ouzou
<b>862</b>	Eté	Croisé	Agé	Femelle	+	+	Tizi-Ouzou
<b>3450</b>	Printemps	Fleckvieh	Intermédiaire	Femelle	+	+	Béjaia
<b>3794</b>	Automne	Montbéliard	Agé	Femelle	+	+	Béjaia



**Figure 84 :** Photos représentant des Co-infections à *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum* avec présence des œufs des deux parasites dans la bile (A) (Gr. X 400) et les matières fécales (B) (Gr. X 100)

## II. Réaction croisée en Sérologie (ELISA) entre *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum* :

Durant notre étude des kites ELISA dirigés contre *Fasciola hepatica* ont été utilisés sur nos sérums de bovins prélevés, y compris nos 21 bovins positifs à *Dicrocoelium dendriticum*, tous se sont révélés être séronégatifs avec ( $Val < 10\%$ ) sauf nos six bovins présentant une co-infection au deux parasites qui ont tous révélé des valeurs comprises entre ( $45\% < val < 75\%$ )(Tableau XXXXX), ce qui confirme l'absence de réaction croisée entre les deux distomes en utilisant le kite Monoscreen ELISA.

**Tableau XXXXX:** Tableau représentatif des résultats sérologiques des 21 bovins positifs à *Dicrocoelium* dont les 6 bovins co-infectés par la fasciolose et la dicrocéliose.

saison	race	âge	sexe	Total <i>Fasciola</i>	%E/P	ELISA	Total Dicro	wilaya
Hiver	Montbéliard	Agé	Femelle	-	5,20%	0	+	Tizi-Ouzou
Printemps	Holstein	Intermédiaire	Femelle	+	63,58%	++	+	Tizi-Ouzou
Printemps	Montbéliard	Agé	Femelle	+	65,09%	++	+	Tizi-Ouzou
Printemps	Montbéliard	Agé	Femelle	+	61,58%	++	+	Tizi-Ouzou
Printemps	Croisé	Jeune	Femelle	-	0,51%	0	+	Tizi-Ouzou
été	Croisé	Agé	Femelle	+	64,05%	++	+	Tizi-Ouzou
été	Croisé	Jeune	Mâle	-	2,36%	0	+	Tizi-Ouzou
Printemps	Montbéliard	Intermédiaire	Femelle	-	1,97%	0	+	Tizi-Ouzou
été	Montbéliard	Intermédiaire	Mâle	-	2,59%	0	+	Tizi-Ouzou
Automne	Montbéliard	Intermédiaire	Mâle	-	0,03%	0	+	Tizi-Ouzou
Automne	Montbéliard	Intermédiaire	Femelle	-	1,24%	0	+	Tizi-Ouzou
Printemps	Fleckvieh	Intermédiaire	Mâle	-	2,39%	0	+	Bouira
Printemps	Croisé	Agé	Femelle	-	2,46%	0	+	Bouira
Printemps	Montbéliard	Agé	Femelle	-	2,13%	0	+	Bouira
été	Montbéliard	Agé	Femelle	-	0,55%	0	+	Bouira
été	Fleckvieh	Agé	Femelle	-	3,03%	0	+	Bouira
Automne	Montbéliard	Agé	Femelle	-	1,41%	0	+	Bouira
Automne	Croisé	Intermédiaire	Mâle	-	0,39%	0	+	Bouira
Printemps	Fleckvieh	Intermédiaire	Femelle	+	51,27%	++	+	Bejaia
été	Montbéliard	Intermédiaire	Mâle	-	1,19%	0	+	Bejaia
Automne	Montbéliard	Agé	Femelle	+	71,74%	++	+	Bejaia

### 1- Discussion de la fasciolose

La fasciolose à *Fasciola hepatica* est une pathologie parasitaire qui est assez fréquemment rencontrée en Algérie, A l'issue des quatre techniques de diagnostique la prévalence totale de la fasciolose chez les 4700 bovins échantillonnés est 8.27% (389 sur 4700) ,avec 325 (6.91%) foies présentant une cholangite distomienne au niveau des trois wilayas, ces résultats sont comparables à ceux obtenus par de nombreux auteurs tels que dans l'ouest de l'Iran avec 7.6% (Ezatpour et *al.*, 2014), 3,28% dans le centre de l'Iran (Khoramian et *al.*, 2014), au niveau de trois abattoirs AB1, (3.2%, 2.2% et 2.0%), AB2 (6.4%, 4.6% et 3.5%), AB3 (14.4%, 6.9% et 9.5%) durant l'année 2010, 2011 et 2012 respectivement chez les bovins en Afrique du sud (Jaja et *al.*, 2017).

La prévalence globale observée chez les bovins était inférieure aux valeurs publiées précédemment dans la région de Jilel (27,0%) (Mekroud et *al.*, 2004) et à El Tarf (26,7%) (Ouchene-Khelifi et *al.*, 2018).

D'autres auteurs ont rapporté des prévalences un peu plus élevées avec 13.67% à borno state Nigeria (Liba et *al.*, 2018), 14.56% au centre nord du Nigeria (Ejeh et *al.*, 2015) , 27.68% à Sokoto, Nigeria (Magaji et *al.*, 2014).

La prévalence la plus élevée a été notée dans la wilaya de Bouira avec 8.28% suivie de celle de Tizi-Ouzou 6.87% et enfin celle de Béjaia avec 5.92% ceci serait dû à un meilleur suivi des vétérinaires praticiens de la wilaya de Tizi-Ouzou et Bejaia des bovins vis-à-vis de cette parasitose par l'administration d'anthelminthiques. Cette variation est probablement liée au climat et l'aptitude de l'environnement pour les stades libres de *F. hepatica* et son hôte intermédiaire (Mas-Coma et *al.* 2009a). Une température comprise entre 10 et 25 ° C est requise pour la survie et la reproduction de *Fasciola hepatica* et *G. truncatula* (Rapsch et *al.*, 2008; Fox et *al.*, 2011).

Cependant nos résultats ont également montré que 236(5.51%) foies quand à eux présentaient des lésions hépatiques avec inflammation des canaux biliaires sans la présence du parasite ces lésions peuvent correspondre à des atteintes multiples ou à des cas d'animaux en voie de guérison de la parasitose d'où l'absence du parasite, et enfin 3718(86.89%) foies ont révélé des foies macroscopiquement sains.

Sur les 4700 prélèvements fécaux de bovins récoltés dans les abattoirs des trois wilayas Tizi-Ouzou, Bouira et Béjaia, les analyses coproscopiques nous ont permis de détecter la présence d'œufs de *Fasciola hepatica* chez un seulement 149 bovin soit une prévalence de 3.17%. Ces résultats sont comparables à celui décrit par Baldock et Arthur (1985) 1.1%.

Ce très faible résultat en coprologie pourrait s'expliquer par le fait que les œufs sont émis en petits nombres, sur une courte période (Rippert C., et al., 1998) et cette ponte des douves adultes est intermittente dépendant en particulier de la vidange biliaire. Ainsi, les œufs de *Fasciola hepatica* s'accumulent et se retrouvent emprisonnés dans la vésicule biliaire ; ce qui explique les réponses faussement négatives. La coprologie peut également révéler des faux négatifs si l'intensité parasitaire est inférieure à 20 parasites (Doyle, 1972 ; Mekroud et al., 2004 ; Chauvin., 2006), ou par le fait qu'un seul examen négatif n'infirmé pas le diagnostic. Seuls trois examens itératifs et négatifs, espacés de huit à dix jours, du fait de périodes « muettes » dans les pontes parasitaires, pourront infirmer le diagnostic (Dereure, 2008) , cela n'a malheureusement pas pu être établi durant notre étude du fait de l'abattage des animaux. La coproscopie individuelle sur un seul échantillon, d'après Lafay et Mage (1976), ne permettrait la détection d'une infestation par *Fasciola hepatica* que dans un cas sur deux (faible sensibilité de la technique). Le nombre d'O.P.G. (œufs par gramme de fèces) ne serait de plus pas significatif du degré d'infestation parasitaire (Mage, 1988). Elle a cependant l'avantage d'être l'une des méthodes les plus utilisées.

Les résultats de l'analyse du culot biliaire après centrifugation ont révélé la présence d'œufs de *Fasciola hepatica* chez 315 bovins soit une prévalence de (6.7%) au niveau des trois wilayas. Ce résultat est bien plus important par rapport aux résultats de l'analyse coproscopique (3.17%). Ceci confirme l'accumulation des œufs de *Fasciola*

*hepatica* dans la vésicule biliaire et par conséquent négative nos résultats coproscopiques.

### **1.1. Par rapport aux facteurs de risques**

Notre étude statistique a été réalisée sur l'ensemble de notre échantillonnage au niveau des trois wilayas soit sur 4700 bovins à l'issue des résultats des 4 techniques de diagnostique.

Notre étude a révélé l'existence d'une association significative entre l'atteinte fasciolienne et le sexe, la race, l'âge de l'animal et la saison de l'année  $p < 0.001$  ; sur 615 des femelles 203(33.01%) étaient positives et sur 4085 des mâles seulement 186(4.55%) étaient positifs, ainsi il semblerait que les femelles soient beaucoup plus réceptives à la maladie. Cela serait dû d'une part à leur durée de vie plus longue que les mâles ce qui les expose davantage à l'infestation et au développement de la maladie, à leurs physiologie (gestation, lactation) et donc diminution de l'immunité et plus vulnérables à des maladies parasitaires et d'autre part par le fait que le mode d'élevage des femelles dans la région de la Kabylie (Tizi-Ouzou, Bouira, Béjaia) est souvent extensif. Les femelles ont tendance à pâturer et donc à être plus exposées et plus infestées contrairement aux mâles dont le mode d'élevage est souvent intensif pour l'engraissement, et la nature de leur alimentation est souvent des céréales en graine ou concassée ce qui les expose à moins de risques d'infestation. Pour le facteur âge, Il semblerait qu'il y ait une relation directe avec le facteur sexe, du fait que les mâles sont abattus plus jeunes contrairement aux femelles dont l'abattage est interdit à moins de 5ans sauf les cas d'urgence et l'abattage sanitaire.

Une association significative a également été démontrée entre l'atteinte fasciolienne et la race de l'animal ,en effet les races qui semblent être les plus sensibles à l'infestation sont la race Montbéliard avec 135 (12.63%) bovins positifs suivie de la race Holstein avec 106 (10.17%) bovins positifs ,ces résultats semblent corrélés avec les autres facteurs de risque du fait qu'il s'agisse de races laitières correspondant aux femelles qui à cause de leurs physiologie gestation ,lactation on assiste souvent à une diminution de leurs immunité ; on note également leur durée de vie plus longue(voir facteur sexe ci-dessus), suivie par la race croisé, et enfin charolaise ,cette dernière n'a

présenté quant à elle aucun cas de fasciolose 0% ce résultat s'explique par le fait qu'il s'agisse d'une race à viande représentée exclusivement par le sexe mâle dont le mode d'élevage ,le mode alimentaire et la durée de vie étaient (comme cité ci-dessus dans le facteur sexe) défavorables à l'atteinte parasitaire .

Selon nos résultats, il semblerait que la saison du printemps soit la plus propice à la fasciolose avec une prévalence de 117(11.42%), suivie de celle de l'été avec 80(8.12%), Automne 126(7.47%) ,et enfin l'hiver avec 66(6.57%).dans cette présente étude notre analyse statistique a été réalisée sur la totalité des bovins prélevés 4700 ,avec les résultats obtenus à partir des quatre techniques de diagnostique à savoir (l'inspection des foies ,l'analyse de la bile et la coprologie) ces dernières correspondent au diagnostique de la forme chronique de la maladie qui n'apparait que trois mois après l'infestation par les metacercaires ,contrairement à la sérologie(ELISA) qui quant à elle peut à la fois correspondre à la forme chronique comme à la forme aigue ; en effet la sérologie nous permet de détecter les anticorps dirigés contre *Fasciola hepatica* deux semaines après infestation.

Ainsi cette forte prévalence au Printemps est le résultat de l'infestation des bovins soit, en Automne qui à cette période ; l'herbe n'atteint pas son abondance du printemps et l'humidité redevient suffisamment favorable pour que les limnées infestées s'éloignent de leurs zones de vie permanente et libèrent à cette occasion des cercaires. Les bovins vont se rapprocher des zones humides qu'ils avaient jusque là plus ou moins délaissées, où l'herbe est plus abondante. Dans ce cas l'infestation correspond aux formes chroniques; soit à des animaux infestés durant la saison du Printemps qui à cette période on constate la présence des premières métacercaires infestantes provenant soit de la population de métacercaires ayant survécu à l'hiver, soit de cercaires issues de limnées parasitées trans-hivernantes. Cette catégorie correspond à la forme aigue décelable par la technique ELISA.

## **2-Discussion de la dicrocœliose**

Au cours de cette étude, le *Dicrocoelium dentriticum* a été découvert pour la première fois dans certains abattoirs du nord de l'Algérie, notamment Bejaia, Tizi-Ouzou et Bouira, avec des prévalences respectives de 0,17%, 0,66% et 0,54%, avec une

prévalence totale de 0,44%. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par de nombreux auteurs avec des prévalences de la dicrocoélie augmentant de 1,47, 1,76 et 2,10% en 1999-2000 à 0,69, 0,34 et 0,25% en 2003-2004 chez les bovins, les ovins et les caprins respectivement (Ansari-Lari and Moazzeni, 2006), et 1, 0,8 et 1% des foies saisis à cause de *Dicrocoelium dentriticum* chez les ovins, les caprins et les bovins, respectivement dans l'ouest de l'Iran (Shahbazi et al., 2016), Arbabi et al., (2018) quant à eux ont signalé une prévalence de 0,77% chez les bovins, caprins et les ovins. Quant à la région de la Mitidja en Algérie une seule étude a rapporté la présence de *Dicrocoelium* spp. dans quelques abattoirs avec une prévalence de 0.07% et 0.86% chez les bovins avec présence du parasite et la présence d'œufs dans la bile respectivement (Chaouadi et al., 2018). Par ailleurs, d'autres auteurs ont noté des prévalences plus élevées, notamment Schweizer et al., (2003) avec 47,2% des cas de dicrocoélie chez les bovins au niveau des abattoirs en Suisse; Jithendran and Bhat, (1996) ont constaté que 8,1% des ovins et 4,1% des caprins étaient positifs pour la dicrocoélie en Inde; dans le nord du Niger, la prévalence de la dicrocoélie était de 56% chez les bovins, 13,1% chez les ovins et 5,2% chez les caprins (Schillhorn van Veen et al., 1980).Asanji et Williams, (1984) ont signalé 61,8% des cas chez des bovins en Sierra Leone; Aminzare et al., (2018) ont constaté que (5,95%) des ovins et des caprins abattus à l'abattoir de Nishapour avaient été condamnés.

Parmi les 4700 échantillons de selles de bovins prélevés dans des abattoirs des trois wilayas, une analyse coproscopique a mis en évidence la présence d'œufs de *Dicrocoelium dentriticum* chez seulement 10 bovins, soit une prévalence de 0,21%. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Levasseur en 2002 qui montrait une faible excrétion fécale des œufs de *Dicrocoelium* chez les bovins, avec un nombre d'OPG allant de 0 à 250 et une moyenne proche de 15, ce qui rend très souvent le diagnostic faussement négatif, Naeemipour et al., (2016) ont signalé une prévalence de l'infection de 56% et 7% dans 550 échantillons par les méthodes ELISA et EPG, respectivement. D'autres auteurs ont signalé des prévalences plus élevées; Cringoli et al., (2002) en Italie, qui, d'après une étude coprologique de 81 élevages de bovins et de 197 élevages d'ovins, ont indiqué que les bovins de 43 exploitations sur 81 (53,1%) étaient positifs pour *Dicrocoelium* (16% des animaux) et que les ovins des 133 fermes

(67,5%) étaient positifs pour *D. dendriticum*. Bihagi et al., (2017) ont également noté une prévalence de 3,44% de *Dicrocoelium* spp. chez les chèvres en Inde sur la base d'une étude coprologique.

Ce faible résultat coprologique est principalement dû au stade de développement du parasite, il faut beaucoup de temps pour que l'œuf apparaisse dans les selles (Naeemipour et al., 2016). La plus grande quantité d'œufs excrétés a été trouvée 150 à 180 jours après l'infection (Campo et al., 2000). Tous ces facteurs rendent la méthode coprologique impraticable et peu fiable, notamment en ce qui concerne la vidange biliaire. Ainsi, les œufs de *Dicrocoelium* s'accumulent et restent emprisonnés dans la vésicule biliaire, ce qui explique les réponses faussement négatives. Selon Alzieu et Ducos, (1991) et Levasseur (2002), contrairement aux ovins, l'excrétion d'œufs chez les bovins est souvent faible et variable dans le temps ; l'alimentation et l'utilisation d'un anthelminthique ont également un impact sur l'excrétion des œufs.

En fonction du nombre de parasites, l'intensité de l'excrétion d'œufs sera différente (Naeemipour et al., 2016). Malgré la faible sensibilité de la coproscopie, elle reste l'une des techniques les plus largement utilisée pour le diagnostic de la dicrocoélie.

Les résultats de l'analyse de la bile après centrifugation ont révélé la présence d'œufs de *Dicrocoelium* avec une prévalence de 0,44% sur 4700 (21 bovins) dans les trois wilayas. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de l'inspection des foies qui révélait la même prévalence de la cholangite à 0,44% avec la présence du parasite, cependant ces résultats sont bien plus importants que ceux obtenus lors de l'analyse coproscopique (0,21% soit 10 bovins seulement). Cela confirme l'accumulation d'œufs de *Dicrocoelium dendriticum* dans la vésicule biliaire et fausse donc nos résultats coproscopiques.

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Braun et al., (1995), qui ont trouvé des œufs dans les selles de 13 vaches seulement, contre 44 dans des échantillons de bile de 49 vaches avec des parasites adultes dans le foie. Ils ont montré que la sensibilité pour la détermination des œufs de *D. dendriticum* dans les échantillons de matières fécales et biliaires était respectivement de 27% et 90%. Par conséquent, nos résultats confirment donc la fiabilité de l'analyse du culot biliaire pour la détection des

œufs de *Dicrocoelium dentriticum* par rapport à la coproscopie. Cependant, du vivant de l'animal, la technique par ponction de la vésicule biliaire sous contrôle ultrasonore entre les espaces intercostaux 8 et 12 pour la détection des œufs de *Dicrocoelium dentriticum* dans la bile est assez délicate à mettre en œuvre dans la pratique actuelle (Braun et Gerber, 1992).

## **2.1. Etude des facteurs de risque**

Au cours de notre recherche, l'analyse statistique a révélé la présence d'une faible association significative entre la dicrocœliose et la saison  $p=0,038$ , avec une prévalence plus élevée au printemps (0,87%) suivie de celle en été (0,61%); en automne (0,29%) et enfin en hiver (0,09%)., nos résultats sont comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs qui ont rapporté des résultats avec une association significative entre la saison et la dicrocœliose chez les ovins, les bovins et les caprins ( $p < 0,001$ ); seulement les condamnations hépatiques dues à la dicrocœliose étaient fréquentes en Automne chez les ovins et les bovins et en hiver chez les chèvres (Shahbazi et al., 2016). Cependant d'autres auteurs n'ont rapporté aucune différence significative entre la dicrocœliose et la saison de l'année (Arabi et al., 2018).

D'autre part, nos résultats ont également montré une forte association significative entre la dicrocœliose et le sexe, l'âge de l'animal  $p < 0,001$ ; Sur 615 femelles, 15 (2,44%) étaient positives et sur 4 085 mâles, 6 seulement (0,15%) étaient positifs, ainsi les femelles semblent beaucoup plus sensibles à cette parasitose que les mâles.

Cela est dû d'une part à leur durée de vie plus longue que celle des mâles, ce qui les rend plus vulnérables à l'infestation et au développement de la maladie, à leur physiologie (gestation, lactation) ce qui réduit considérablement leurs immunités et deviennent ainsi plus sujettes aux différents parasitismes, et d'autre part à leur mode d'élevage qui est souvent extensif. Les femelles ont tendance à pâturer et sont donc plus exposées et infestées, contrairement aux mâles, dont l'élevage est souvent intensif car ils sont destinés à l'engraissement et dont la nature de leur régime alimentaire est souvent constitué de céréales en graines ou en farine, ce qui les expose à un moindre risque d'infestation. En ce qui concerne le facteur âge, il semble exister un lien direct

avec le facteur sexe, les mâles étant abattus à un plus jeune âge, contrairement aux femelles dont l'abattage est interdit à moins de cinq ans, sauf en cas d'abattage d'urgence ou de femelle réformée. Nos résultats sont comparables à ceux de Bihagi *et al.*, (2017), qui ont signalé une incidence plus élevée d'helminthes gastro-intestinaux chez les femelles que chez les mâles.

La Dicrocoeliose est la sixième parasitose bovine et ovine d'importance économique la plus répandue, en raison des nombreuses pertes qu'elle entraîne (diminution de la production laitière, réduction du poids de la carcasse, stérilité possible, infertilité et enfin saisie des foies parasités à l'abattoir (Ducháček and Lamka, 2003).

L'analyse histologique des douves de *Dicrocoelium* montre que les douves collectées en Algérie sont des *Dicrocoelium dendriticum*, ceci par le positionnement antérieur des testicules en tandem ou légèrement oblique contrairement à *Dicrocoelium chinensis* qui sont en position bilatérale (Otranto *et al.*, 2007), et dont la largeur maximale est au centre ou dans la partie postérieure du corps.

Le corps du parasite est plat et translucide, révélant tous les organes. Nos résultats montrent donc des tailles de parasite plus courtes allant de 2,8 à 4,5 mm, ce qui les différencie des *Dicrocoelium hospes* souvent plus allongés (Bourgat *et al.*, 1975).

### **3. Résultats sérologiques**

L'élaboration de l'analyse sérologique a été établie dans quatre buts

1-confirmation de l'infestation à *Fasciola hepatica* des foies de bovins présentant des cholangite distomienne (un total de 325 sérums).

2-détermination des lésions hépatiques dues à *Fasciola hepatica* chez les bovins présentant des cholangites non distomiennes (un total de 236 sérums).

3- Déceler d'éventuelles formes aiguës de la parasitose à *Fasciola hepatica* par échantillonnage au hasard de 114 sérums de bovins à partir des 3718 bovins présentant des foies macroscopiquement sains

4- Déceler d'éventuelles réactions croisées entre *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum*

5- Evaluation de la Cinétique des anticorps à *Fasciola hepatica* chez les bovins naturellement infectés abattus au niveau des abattoirs au nord de l'Algérie (Tizi-Ouzou, Bouira et Béjaia) selon plusieurs facteurs de risques.

A l'issue de l'analyse sérologique des 675 sérums, un total de 384 (56.9%) sérums se sont révélés être séropositifs, 12 (1.78%) seulement se sont révélés douteux et 279 (41.33%) séronégatifs. Ces résultats montrent une plus grande sensibilité du test ELISA pour la détection de la parasitose comparée à l'inspection des foies au niveau des abattoirs qui était de 325 (48.14%) ces résultats sont comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs qui ont rapporté que l'inspection des viandes à l'abattoir a une sensibilité inférieure à celle des méthodes basées sur la sérologie (Mazeri et al., 2016). Ceci revient au fait que la sérologie nous permet la détection de l'infestation à *Fasciola hepatica* durant la période prépatente durant laquelle les jeunes douves se déplacent en traversant la muqueuse digestive du nouvel hôte avant de pénétrer dans le foie à travers la capsule de Glisson et une migration dans le parenchyme hépatique pour enfin pouvoir se fixer dans les canaux biliaire et devenir adulte une période qui dure environ 3 mois durant la quelle l'inspection des foies sera négative d'où l'intérêt de la sérologie dans la détection précoce de la parasitose.

La séropositivité des bovins au niveau des trois wilayas Tizi-Ouzou, Bouira et Béjaia était respectivement de 56.05% ,59.45% et 55.24% ce qui est en corrélation avec les résultats obtenus par inspection des foies révélant une plus forte positivité dans la wilaya de Bouira. Une grande variation dans les taux d'anticorps chez les bovins positifs a été révélée sur les 56.9% de bovins séropositifs , 12.29% présentaient un faible taux d'anticorps ( $15\% < \text{val} < 45\%$ ), 16.44% présentaient un taux d'anticorps moyens ( $45\% < \text{val} < 75\%$ ), et 28.15% des bovins présentaient quant à eux des taux d'anticorps élevés ( $75\% < \text{val}$ ) , cette variation serait due probablement à l'état physiologique et immunitaire des bovins et au taux d'infestation par les metacercaires , Boulard et Regnault (1989) montrent que les réponses sérologiques individuelles chez les bovins expérimentalement infestés par des doses répétées de métacercaires sont variables, d'un bovin à l'autre. les douves sont continuellement en contact avec du parenchyme hépatique sain, suggérant une dépression de la réponse inflammatoire et

de la réponse immunitaire, ce qui faciliterait leurs migrations à travers le parenchyme sain (Chauvin & Boulard, 1996).

Durant notre études aucune réaction croisée n'a été trouvée par l'analyse sérologique chez les bovins atteints de *Dicrocoelium dendriticum* ce qui confirme la forte spécificité du test. Cependant les 6 cas de bovins présentant une coïnfection à *Fasciola hepatica* et à *Dicrocoelium dendriticum* ont tous révélé des valeurs de taux d'anticorps anti *Fasciola hepatica* compris entre (45%<Val<75%) ce qui suggère une réponse immunitaire moyenne comparée à une mono-infestation.

Le teste de **khi-deux** a révélé l'existence d'une association significative entre l'atteinte hépatique à l'inspection des foies et les taux d'anticorps révélé en ELISA ( $p<0.001$ ), en effet, notre étude a montré une forte sensibilité de l'ELISA dans la détection de la parasitose soit 98% des foies présentant une cholangite distomienne se sont révélés être séropositifs ce qui correspondait à des formes bien installées de la parasitose, cette catégorie des foies présentaient les taux d'anticorps les plus élevés avec 190 (58.46%) qui avaient des valeurs supérieures à ( $VAL>75\%$ ) cette forte réponse immunitaire serait due à l'action irritative des douves adultes nouvellement présentes dans les canaux biliaires et à une forte charge parasitaire des foies ce qui confirmerait que Les réponses aux IgG1 sont corrélées à la charge parasitaire, ce qui indique que la charge antigénique joue un rôle important dans le développement de ces réponses (Beesley et al., 2018). Ces taux d'anticorps tendent à diminuer à 29.84% présentant des taux moyens (45%<val<75%) et enfin 10.15% présentant des valeurs comprises (15%<val<45%) cette diminution des taux d'anticorps serait due a une stabilisation de la parasitose qui correspondrait à des formes chroniques de la maladie caractérisées par des taux d'anticorps plus faibles.

Seulement Trois cas (0.44%) d'animaux présentant des douves à l'inspection des foies se sont montrés séronégatifs par le test ELISA (val<10%) et deux cas (0.29%) de bovins présentant une cholangite distomienne ont révélé des taux d'anticorps douteux compris entre (10%<val<15%). Ces résultats ont déjà été rapportés par certains auteurs (Boulard et al., 1985) et pourraient s'expliquer par une diminution de la stimulation

du système immunitaire de l'hôte lorsque les douves sont installées dans les canaux biliaires ou à une détérioration du système immunitaire due à un pluri parasitisme.

Sur les 236 foies présentant une cholangite non distomienne (lésions hépatiques avec absence de parasite) 79.66% se sont révélés être séronégatifs ( $val < 10\%$ ) ce qui laisserait penser à des lésions dues à d'autres pathologies, aucun sérum n'a présenté des taux d'anticorps élevés et seulement 4.66% présentaient des taux d'anticorps moyens compris entre ( $45\% < val < 75\%$ ) ces résultats confirment l'importance de la charge parasitaire dans l'expression d'une forte réponse immunitaire comme c'est le cas chez les bovins présentant un foie infesté de douves, 0.84% ont présenté des valeurs d'anticorps douteux compris entre ( $10\% < val < 15\%$ ) et 14.83% quant à eux présentaient des taux d'anticorps faibles ( $15\% < val < 45\%$ ) ces résultats correspondraient à des animaux ayant subi un traitement, vu que les tests de détection des anticorps ont une excellente sensibilité, les anticorps peuvent néanmoins rester dans le sérum pendant plusieurs mois après un traitement réussi (Beesley et al., 2018).

Cependant les méthodes sérologiques décèlent la présence d'anticorps anti fasciola et non l'infestation au moment de la prise de sang vu que les anticorps témoins peuvent persister pendant 12 semaines après traitement (idexx fasciolosis verification).

Sur les 114 bovins présentant un foie macroscopiquement sain 77.19% étaient séronégatifs ce qui confirme la non infection des bovins, 7% avaient des taux d'anticorps douteux ( $10\% < val < 15\%$ ) et 13.16% avaient des taux compris ( $15\% < val < 45\%$ ) ces catégories correspondraient à des animaux récemment infestés par les metacercaires présentant des formes aiguës de la parasitose vu l'absence de lésions au niveau des foies qui macroscopiquement étaient sains, l'infection à *Fasciola* spp. se caractérise par une augmentation d'IgG spécifique du parasite, normalement détectable à 4 semaines poste infestation (wpi) et atteignant un pic entre 8 et 10 wpi (Martínez et al., 2014 ; Salimi et al., 2005) ; 2.63% présentaient des taux d'anticorps plus élevés compris entre ( $45\% < val < 75\%$ ) ce qui correspondrait aux formes aiguës de 8 à 10 wpi qui à cette période on constate une augmentation considérable des taux d'anticorps.

La sérologie est devenue le moyen le plus rapide et le plus efficace dans la détection de la fasciolose au cours de ces dernières années. Les titres d'antigènes de la fasciolose deviennent positifs au début de la migration du parasite et sont détectables 2 à 4 semaines après la première exposition au système immunitaire de l'hôte. Les techniques de dosage ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Absorbant Assay) ont largement remplacé les tests de détection des œufs du parasite dans les selles en raison de leur rapidité, de leur sensibilité et de leur quantification. (Santiago et Hillyer, 1988) (Hassan et *al.*, 2001). Les taux d'anticorps des sérums sont souvent en corrélation positive avec le degré d'infestation. (Sezgin et *al.*, 2004) Il faut également 5 à 7 semaines après l'infection initiale pour que les vers adultes soient suffisamment matures pour produire des œufs ; ainsi, il n'y a pas d'œufs dans les selles pendant la phase aiguë de l'infection. Les niveaux d'anticorps sont également en corrélation positive avec la charge infectieuse. Les traitements réussis et l'élimination des parasites sont en corrélation avec une diminution des titres d'anticorps en ELISA pour les antigènes de la fasciolose. Cependant les anticorps peuvent encore être détectables à des niveaux faibles pendant des années. Des études chez l'homme ont rapporté que le test devient indétectable chez environ 65% des patients un mois après le traitement réussi. Certains patients auront un titre positif faible à vie sans aucune preuve d'infection active (Koç et *al.*, 2009)(Dias et *al.*, 1996).

### **Variation des taux d'anticorps selon la saison de l'année**

Nos résultats montrent une très grande variation dans les taux d'anticorps révélés en ELISA, avec des taux élevés enregistrés durant la saison d'Automne et Printemps en effet sur les 190 bovins présentant des taux élevés d'anticorps (+++) 33.68% étaient en Automne et 31.05% étaient au Printemps et seulement 12.10% étaient en Hiver.

Notre présente étude suggère une association significative entre les taux d'anticorps et la saison de l'année ( $p < 0.001$ ), cette association a été précédemment rapportée par de nombreux auteurs où les niveaux les plus élevés étaient en Automne et Printemps, cette tendance a été précédemment observée chez d'autres populations (Kuerpick et *al.*, 2012; Bloemhoff et *al.*, 2015; Munita et *al.*, 2016). Alors que d'autres auteurs ont

enregistré des taux d'anticorps élevés en Automne et Hiver. Ces divergences de résultats seraient dues aux différences à la fois d'habitudes d'élevage et à la variation climatique d'un pays à un autre (Byrne et *al.*, 2018).en effet en Algérie Les agriculteurs du Nord, mettent en place deux périodes de pâturage saisonnières au Printemps et en Automne et amènent le bétail à l'intérieur des étables à la fin de l'Automne ou en Hiver . Ainsi, les bovins sont de plus en plus exposés à l'infestation au cours de ces mois de pâturage, ce qui entraîne une augmentation en taux d'anticorps (val%) en Automne et au printemps (Relf et *al.*, 2011; Bloemhoff et *al.*, 2015).

En Algérie on distingue deux périodes de pâturage autrement dit deux périodes à risque de contamination des bovins par les metacercaires de *Fasciola hepatica*, la première étant le Printemps qui représente le début de la présence des premières métacercaires provenant soit de la population ayant survécu à l'hiver ,soit de cercaire issues de limnées parasitées transhivernantes.

La deuxième période étant l'Automne sur cette période l'herbe n'atteint pas son abondance du printemps et l'humidité redevient suffisamment favorable pour que les limnées infectées s'éloignent de leurs zones de vie permanente et libèrent à cette occasion des cercaires ,les bovins vont ainsi se rapprocher des zones humides qu'ils avaient jusque là plus au moins délaissées où l'herbe est plus abondante cependant à cette période on constate un nombre accru de limnées et par conséquent un plus grand nombre de limnées parasitées ; on se retrouve donc avec une charge élevée en éléments infestants sur les végétaux d'où les taux les plus élevés en anticorps.

### **Variation des taux d'anticorps selon le sexe de l'animal**

Une association significative entre les taux d'anticorps et le sexe de l'animal a été montrée ( $P < 0.001$ ) ,en effet durant notre étude les femelles ont tendance à montrer des taux d'anticorps plus élevés que les mâles ,sur 190 sérums présentant des taux d'anticorps ( $VAL > 75\%$ ) 67.36% étaient des femelles contre seulement 32.63% des mâles tandis-que sur les 83 des sérums présentant les taux d'anticorps les plus faibles( $15\% < val < 45\%$ ) ,15 % sont rencontrés chez les mâles et seulement 8.45% chez les femelles .

Cette variation est en relation directe avec le mode d'élevage en Algérie qui est souvent extensif chez les femelles, qui ont tendance à pâturer et à être plus exposées aux différents parasitismes ce qui représente un risque d'infestation avec des charges parasitaires plus importantes d'où les taux d'anticorps élevés, du moment où plusieurs auteurs ont confirmé (Santiago et Hillyer, 1988 ; Hassan et al., 2001) que les taux d'anticorps des sérums dirigés contre *Fasciola* sont souvent en corrélation positive avec le degré d'infestation (Sezgin et al., 2004).

Globalement, plus les vaches laitières sont mises au pâturage longtemps, plus les niveaux d'anticorps antiparasitaires sont élevés. Le co-pâturage avec les ovins et les caprins augmentait également de manière significative le risque de surcharge parasitaire élevé (Arenal et al., 2018)

Ce phénomène est tout autre chez les mâles qui sont destinés à la production de viande chez lesquels l'élevage intensif est favorisé et ne pâture que très rarement d'où un risque moindre d'infestation où du moins une infestation avec de faibles charges parasitaires d'où des taux d'anticorps souvent faibles.

### **Variation des taux d'anticorps selon l'âge de l'animal**

L'analyse de Pearson Chi-square a révélé l'existence d'une association significative entre les variations des taux d'anticorps et l'âge de l'animal, en effet sur les 190 sérums présentant des taux d'anticorps élevés 43.15% étaient âgés (>4ans) et 51.05% d'un âge intermédiaire (2<âge<4ans) et seulement 5.78% étaient jeunes (<2ans), cette variation des taux d'anticorps selon le facteur âge semble avoir une relation directe avec le facteur sexe du fait que la catégorie jeune correspond dans la majorité des cas aux mâles qui sont abattus très jeunes pour la boucherie ce qui leur laisse peu de temps pour l'infestation contrairement à la catégorie intermédiaire et âgée qui correspondent souvent aux femelles dont l'abattage est interdit à moins de cinq ans sauf en cas d'abattage sanitaire ou d'abattage d'urgence ou d'infertilité de la vache cette catégorie offre plus de temps aux animaux de s'infester ce qui nous prouve que l'âge est en corrélation positive avec l'infestation des bovins à *Fasciola hepatica*.

### **Variation des taux d'anticorps selon la race de l'animal :**

L'existence d'une association significative entre les variations des taux d'anticorps anti *Fasciola hepatica* et la race de l'animal a été trouvée ( $p < 0.001$ ), en effet notre étude n'a montré aucun cas de séropositivité chez la race charolaise ceci serait dû d'une part à sa résistance vis-à-vis de la parasitose d'une autre part du fait que la race charolaise correspond à des bovins mâles destinés à la boucherie, leur mode d'élevage est donc intensif pour l'engraissement ; leur alimentation est souvent des farines ou graines concassées en rajoutant à cela leur abattage jeune, ce qui leur confère peu de risque d'infestation qui en général est en corrélation positive avec le pâturage et la durée de vie plus longue.

Les taux d'anticorps les plus élevés ont été enregistrés chez les races Montbéliard suivis de race Holstein et croisé tandis que la race Fleckvieh semble présenter des taux d'anticorps plus faibles cette variation montre que le facteur race joue un rôle dans la sensibilité des bovins vis-à-vis de la parasitose.

### **Variation des taux d'anticorps selon la localité :**

Le test de Pearson Chi-square a révélé la présence d'une association significative entre la variation des taux d'anticorps selon la localité des bovins (Tizi-Ouzou, Bouira, Béjaïa) avec des taux les plus élevés d'anticorps au niveau de la wilaya de Bouira suivis de Tizi-ouzu et enfin Béjaïa. Cela pourrait s'expliquer par les différences environnementales locales ainsi que par les différences dans les pratiques de gestion des exploitations locales (Bennema et al., 2011), dans le cadre de notre étude les caractéristiques environnementales sont presque similaires avec des taux de pluviométrie les plus élevés au niveau de la wilaya de Béjaïa ainsi les différences environnementales à elles seules ne contribuent pas aux variations de l'infestation au niveau des différentes localités cependant les pratiques de gestion des exploitations seraient les plus incriminées dans cette variation. On cite comme facteur Le co-pâturage avec les ovins et les caprins qui augmenterait de manière significative le risque de surcharge parasitaire (Arenal et al., 2018), ce dernier semble plus fréquent au niveau de la wilaya de Bouira d'où les taux d'anticorps les plus élevés.

#### 4. Discussion sur les analyses moléculaires

La fasciolose est une zoonose d'origine alimentaire causant d'importantes pertes économiques dans le monde entier (Nyindo et Lukambagire, 2015). La lutte contre ces infections nécessite des études épidémiologiques et une caractérisation génétique préalable.

Des études antérieures ont montré que la fasciolose est très courante en Algérie (Mekroud et *al.*, 2004; Righi et *al.*, 2016). La prévalence globale observée chez les bovins était inférieure aux valeurs publiées précédemment dans la région de Jilel (27,0%) (Mekroud et *al.*, 2004) et à El Tarf (26,7%) (Ouchene-Khelifi et *al.*, 2018). Seulement à Souk-Ahras, la prévalence était élevée et atteignait 22,3%. Ouchene-Khelifi et *al.*, (2018) ont signalé une valeur similaire dans la région d'El Tarf. Parmi les wilayas et communes restantes, les valeurs variaient entre 2,3 et 11,5%. Cette réduction apparente de la prévalence pourrait être associée à plusieurs causes, telles qu'un changement de biotope, l'application de plans de contrôle ou une baisse importante du nombre d'hôtes (Mas-Coma et *al.*, 2008). De plus, l'utilisation d'anthelminthiques peut expliquer la faible prévalence observée.

Les résultats actuels sont comparables aux précédentes études épidémiologiques de différents pays. La prévalence globale était de 9,77% en Égypte (ElTahawy et *al.*, 2017) et de 12,6% en Tunisie (Hamed et *al.* 2014). En France, Meissonnier et Mage (2007) ont signalé une fluctuation de la prévalence comprise entre 3,7 et 10,8%. Dans le présent travail, les analyses morphométriques et moléculaires des douves de *Fasciola*, recueillies dans huit wilayas Algériennes, ont révélé l'existence d'une seule espèce (*F. hepatica*).

En effet, en utilisant l'analyse morphométrique, un seul morphotype a été observé. Plusieurs études ont estimé que le rapport longueur /largeur du corps était un caractère approprié permettant de différencier *F. hepatica* de *F. gigantica* (Ashrafi et *al.*, 2006; El-Rahimy et *al.*, 2012; Asadian et *al.*, 2013; Aryaeipour et *al.*, 2017). Farjallah et *al.*, (2009) ont été les premiers à utiliser des marqueurs moléculaires pour caractériser les douves Algériennes (dans la wilaya de Mostaganem) provenant de moutons. Ici, un seul haplotype ITS-1 a été observé dans les huit wilayas étudiées. La séquence

nucléaire ITS-1 est un marqueur phylogénétique cohérent permettant la caractérisation des espèces de *Fasciola* (Itagaki et al., 2005; Farjallah et al., 2009; Rokni et al., 2010; Amor et al., 2011).

Parmi les échantillons étudiés, l'haplotype FhITS2-H2 n'était pas observé. Il avait déjà été signalé en Espagne (Alasaad et al., 2007), en Algérie (Farjallah et al., 2009), et récemment en Amérique du Sud (Valero et al., 2018). Cependant, un nouvel haplotype FhITS2-H3 est décrit pour la première fois, en tant que résultat d'un polymorphisme à la position 935 (T / A). Cet haplotype est probablement répandu dans toute l'Algérie à cause des mouvements des animaux infectés entre les provinces via le nomadisme ou les systèmes de transhumance (Gabli et al., 2015).

Les résultats des marqueurs mitochondriaux étaient cohérents avec ceux retrouvés précédemment (Itagaki et al., 2005; Farjallah et al., 2009; Amor et al., 2011; Carnevale et al., 2017; Rouhani et al., 2017; Sarkari et al., 2017; Valero et al., 2018) dans la mesure où tous les haplotypes Algériens appartenaient à un clade **monophylétique** - *F. hépatica*. Les deux jeux de données COI et NADI ont montré une faible diversité de nucléotides et d'haplotypes, avec sept et cinq haplotypes pour COI et NADI, respectivement. Cependant, COI-trnT-rrnL a montré une faible diversité en nucléotide et une haute diversité d'haplotypes. Ce motif habituellement indique un goulot d'étranglement récent suivi d'une population de croissance rapide (Grant et Bowen, 1998).

L'analyse Median-joining network s'est générée en étoile. Les haplotypes communs (FhCOI-trnT-rrnL-H1, FhCOIH1, et FhNADI-H1), avec une position basale dans les trois réseaux, sont probablement la source de dispersion de *F. hepatica* à travers le pays, en particulier dans la région humide du nord.

De plus, les haplotypes COI et NADI semblent partagés avec plusieurs pays (Tunisie, Egypte, Afrique du Sud, Turquie, La France, l'Italie et l'Espagne), suggérant qu'ils pourraient avoir une origine commune (Le et al., 2000; Itagaki et al., 2005; Lotfy et al., 2008; Farjallah et al., 2009, 2013; Amor et al., 2011; Simsek et al., 2011; Omar et al., 2013; Martínez-Valladares et Rojo-Vázquez, 2014; Wannasan et al., 2014; Mucheka et al., 2015; Valero et al., 2018).

Les références restantes de La Tunisie, la France, l'Italie, l'Espagne, la Chine, le Japon et les États-Unis ont dérivé d'haplotypes communs avec un à trois substitutions de nucléotides. Ces résultats suggèrent que les importations des bovins pourraient avoir un impact significatif sur l'entrée des *F. hepatica* en Algérie. Srairi et al., (2013) ont déclaré que les autorités Algériennes ont assuré l'approvisionnement annuel de bétail importé en réponse à l'expansion démographique.

La majorité du bétail est importée de France et d'Espagne, avec 40 000 / par an.

NJ et ML ont montré de faibles valeurs bootstrap dans le clade de *F. hepatica*, confirmant la relation étroite existant entre les Haplotypes de *F. hepatica* d'origines différentes.

AMOVA a révélé une faible structure de la population en Algérie. De plus, les Mismatch distributions unimodales en forme de L pour COI, NADI et COI-trnT-rrnL ont été observés et des modèles en forme d'étoile pour l'analyse médian-joining network, tous deux compatibles avec les augmentations de population. Les valeurs négatives des tests de neutralité indiquent les mêmes résultats. Au cours des dernières décennies, plusieurs rapports ont indiqué la fièvre aphteuse comme facteur clé affectant plusieurs espèces d'élevage (bovins, ovins et caprins) en Algérie (Samuel et al., 1999, Kardjadj 2018). En effet, après 2014, une épidémie de fièvre aphteuse a détruit 30% du bétail Algérien. La diminution de la taille de la population d'espèces hôtes est clairement une source de la diminution observée de la variabilité génétique du parasite. Les accroissements de population observés ainsi que la prévalence rapportée pourraient être corrélés à l'absence de stratégie de contrôle en Algérie.

La Diversité génétique et l'expansion de la population de *F. hepatica* pourraient également être influencées par l'hôte intermédiaire, *Galba truncatula*, où se produit l'expansion clonale de *Fasciola*, (Beesley et al., 2017). Vilas et al., (2012) ont confirmé le potentiel de l'hôte intermédiaire pour disséminer les métacercaires avec génotype identique au pâturage. Ils ont également trouvé le même multilocus génotype de *Fasciola* partagé entre les hôtes définitifs (bovins et ovins). Lors d'une étude portant sur les bovins et les moutons, Beesley et al., (2017) n'ont trouvé aucune différence significative dans la diversité de *Fasciola*. *Fasciola* a une large gamme d'hôtes qui

peut permettre le maintien de sa diversité génétique chez les animaux sauvages (Beesley et *al.*, 2017).

## Conclusion

Cette étude montre une forte prévalence de *F. hepatica* dans les troupeaux de bovins Algériens pendant et à la fin de chaque saison de pâturage, plus particulièrement la saison du Printemps. Des mesures de contrôle appropriées sont nécessaires chez les vaches laitières adultes, en particulier pendant la lactation. De plus, le test ELISA a clairement montré les changements saisonniers de *F. hepatica* et constitue donc un outil de diagnostic utile et facile à utiliser.

La présente étude fournit des résultats importants concernant la caractérisation génétique et la variabilité de *F. hepatica* en Algérie, ainsi que le rôle important de l'importation de bétail dans la détermination de la voie de dispersion de *F. hepatica* dans le monde. La fasciolose semble être fréquente chez les bovins Algériens de l'est à l'ouest. Bien que les douves Algériennes aient souffert de la récente épidémie de fièvre aphteuse, il semble que l'absence de stratégie de contrôle associée au climat méditerranéen favorable puisse conduire à une reconstruction et à la dispersion de ses populations. L'Algérie est le plus grand pays africain ; par conséquent, de nouvelles études sur les douves de *Fasciola* de différents hôtes et provinces sont essentielles pour mieux comprendre leur histoire génétique et pour mettre au point des mesures de contrôle spécifiques.

A l'issue de nos résultats la sérologie semble être le moyen le plus rapide et le plus efficace dans le diagnostic de la fasciolose, en effet la détection des anticorps dirigés contre *Fasciola* devient positive au début de la migration du parasite et sont détectables 2 à 4 semaines après la première exposition au système immunitaire de l'hôte. Les techniques de dosage ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Absorbant Assay) ont largement remplacé les tests sur les œufs des parasites dans les selles en raison de leur rapidité et de leur sensibilité.

Ce travail visait à déterminer la présence ou l'absence de *D. dendriticum* jamais signalé auparavant en Algérie. Les résultats ont révélé la présence de *D. dendriticum* dans les trois wilayates : Tizi-Ouzou, Bejaia et Bouira. Sa faible prévalence confirme le début de l'introduction du parasite en Algérie, qui pourrait augmenter dans les années à venir si aucune mesure n'est prise.

La wilaya de Tizi-Ouzou a le taux le plus élevé de bovins infestés par la dicrocœliose, suivie de Bouira et enfin de Bejaia.

De plus, les résultats montrent que les distomatoses affectent davantage les femelles et les animaux plus âgés. Les animaux qui pâturent pendant plusieurs années sont plus susceptibles d'excréter des œufs de *D. dendriticum* que ceux de la première année de pâturage.

De nombreuses études sur la dicrocœliose chez différentes espèces de bovins, d'ovins et de caprins doivent être menées en Algérie, tant sur sa prévalence que sur son épidémiologie. En particulier, l'identification moléculaire de la petite douve serait utile pour déterminer son origine et la présence d'une variation intraspécifique des espèces présentes en Algérie.

Ces prévalences révélées doivent nous alerter sur la gravité de la situation et nous appeler à plus de vigilance vis-à-vis de cette parasitose. Nous devons prendre des mesures plus efficaces par un dépistage sérologique (ELISA- technique la plus sensible) dans de différentes régions, et traiter tout animal infesté. Ceci permettra d'éviter toute perte économique lors de l'orientation vers l'abattage des animaux de boucherie et toute diminution de production laitière pour les femelles. Un autre dépistage sérologique doit être établi après traitement des animaux pour pouvoir déceler d'éventuelles résistances chez certains bovins.

## Références bibliographiques

### “A”

1. **Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. (2000).** A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. *Journal. Helminthol.* 74 : 189-194.
2. **Acha P. N. et Szyfres. B. (1989).** Zoonoses et maladies transmissibles commune à l'homme et aux animaux. Office Internationale des Epizooties, Paris ed, 735-743.
3. **Acici, M., Buyuktanir, O., Bolukbas, C.S., Pekmezci, G.Z., Gurler, A.T., Umur, S., 2017.** Serologic detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in sheep in the middle Black Sea region of Turkey. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 50, 377–381.
4. **Acosta, D., Cancela, M., Piacenza, L., Roche, L., Carmona, C., Tort, J.F., 2008.** *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 158, 52–64.
5. **AFSSA(Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments )(2016).** *Fasciola hepatica*, syn. grande douve, douve du foie. Agent de la distomatose hépato-biliaire ou fasciolose. Fiche de description de danger transmissible par les aliments : *Fasciola hepatica*.p :2.
6. **Ai L, Cai Y-C, Lu Y, Chen J-X, Chen S-H (2017)** Human Cases of Fascioliasis in Fujian Province, China. *Korean J Parasitol* 55(1): 55–60
7. **Ai L, Weng YB, Elsheikha HM, Zhao GH, Alasaad S, Chen JX, Li J, Li HL, Wang CR, Chen MX, Lin RQ, Zhu XQ (2011)** Genetic diversity and relatedness of *Fasciola* spp. isolates from different hosts and geographic regions revealed by analysis of mitochondrial DNA sequences. *Vet Parasitol* 181(2–4):329–334.
8. **Aissi M., K. Harhoura, S. Gaid & B. Hamrioui. (2009).** Étude préliminaire sur la prévalence de la fasciolose due à *Fasciola hepatica* dans quelques élevages bovins du nord centre algérien (la Mitidja). *Bulletin de la Société de pathologie exotique.* 102(3), 177-178.
9. **Akaike H (1974)** A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* 19(6):716–723

10. **Alasaad S, Huang CQ, Li QY, Granados JE, Garcia-Romero C, Perez JM, Zhu XQ (2007)** Characterization of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA. *Parasitol Res* 101(5):1245–1250
11. **Ali H, Ai L, Song HQ, Ali S, Lin RQ, Seyni B, Issa G, Zhu XQ (2008)** Genetic characterisation of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities revealed the existence of *F. hepatica* and *F. gigantica* in Niger. *Parasitol Res* 102(5):1021–1024
12. **Alvarez Rojas C. A., Jex A. R., Gasser R. B., & Scheerlinck J. P. (2014)**. Techniques for the diagnosis of *Fasciola* infections in animals: Room for improvement. *Advances in Parasitology*, 85, 65–107.
13. **Alvarez-Sanchez, M. A., Mainar-Jaime, R. C., Perez-Garcia, J., & Rojo-Vazquez, F. A. (2006)**. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*, **159**, 424–425.
14. Alzieu JP, Ducos De Lahitte J.(1991).La dicrocoeliose chez les bovins. *GTV*, 1991, 6, 135-146.
15. **Alzieu, J.-P., Ducos DE Lahitte, Bousquet, E., Bourdenx, L., Louguet, Y., Dorchies, P., 1996**. Dicrocoeliose bovine Actualités bibliographiques Données cliniques et épidémiologiques récentes techniques vétérinaires. *Bull. GTV* 5,13-26.
16. **Alzieu, J.-P., Ducos De Lahitte, J., Bourdenx, L., Jacquet, P., 2002**. La dicrocoeliose bovine : une parasitose émergente et pathogène. *GTV* 13,59-62.
17. **Ambrosi, M., Morettini, B., Ranucci, S. and Tesei, B., (1986)**. Efficacia della somministrazione orale di tiofanato (1-2 bis (3-etossicarbinil-1-tioureido) benzene) per la terapia dell'infestazione da *Dicrocoelium dentriticum* negli ovini. *Riv. Zoot. Vet.*, 14: 25-31.
18. **Amer S, Dar Y, Ichikawa M, Fukuda Y, Tada C, Itagaki T, Nakai Y (2011)** Identification of *Fasciola* species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (NDI and COI) gene markers. *Parasitol Int* 60(1):5–12
19. **Amer S, ElKhatam A, Zidan S, Feng Y, Xiao L (2016)** Identity of *Fasciola* spp. in sheep in Egypt. *Parasit Vectors* 9(1):623

20. **Aminzare, M., Hashemi, M., Faz, S.Y., Raeisi, M., Hassanzadazar, H., 2018.** Prevalence of liver flukes infections and hydatidosis in slaughtered sheep and goats in Nishapur, Khorasan Razavi, Iran. *Vet. World* 11, 146–150.
21. **Amor N, Halajian A, Farjallah S, Merella P, Said K, Slimane BB (2011a)** Molecular characterization of *Fasciola* spp. from the endemic area of northern Iran based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Exp Parasitol* 128:196–204
22. **Amor, N., Halajian, A., Merella, P., Farjallah, S., Said, K., Ben, B., (2011b).** Genetic characterization of *Fasciola* spp. from Tonekabon City (northern Iran) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Pak J Zool* 43, 1061–1067.
23. **Anderson N., Luong T. T., Vo N. G., Bui K. L., Smooker P. M., & Spithill T. W. (1999).** The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 83, 15–24.
24. **Andrews, S. J. (1999).** The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: DALTON, *Journal of Parasitic Fasciolosis*, Ontario: Public. cap. 1.1-29.
25. **Andriamanantena D, Rey P, Perret J.L, Klotz F.(2005).** Distomatoses. EMC *Maladies Infectieuses 2* : 105–118p. Edition Elsevier, France
26. **Ansari-Lari, M., Moazzeni, M., (2006).** A retrospective survey of liver fluke disease in livestock based on abattoir data in Shiraz, south of Iran. *Prev. Vet. Med.* 73, 93–96.
27. **Arafa WM, Hassan AI, Snousi SAM, El-Dakhly KM, Holman PJ, Craig TM, Aboelhadid SM (2018)** *Fasciola hepatica* infections in cattle and the freshwater snail *Galba truncatula* from Dakhla Oasis, Egypt. *J Helminthol* 92:56–63
28. **Arbabi, M., Nezami, E., Hooshyar, H., Delavari, M., 2018.** Epidemiology and economic loss of fasciolosis and dicrocoeliosis in Arak, Iran. *Vet. World* 1648–1655.
29. **Arjona R, Riancho JA, Aguado JM, Salesa R, González-Macías J (1995)** Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of the disease. *Medicine* 74:13–23
30. **Armour, J., 1975.** The epidemiology and control of bovine fascioliasis. *Vet. Rec.* 96, 198–201.
31. **Aryaeipour M, Bozorgomid A, Kazemi B, Behnia M, Azizi H, Rokni MB (2017)** Molecular and morphometrical characterization of *Fasciola* species isolated from domestic ruminants in Ardabil Province, northwestern Iran. *Iran J Public Health* 46(3):318–325

32. **Asadian S, Moheballi M, Mahmoudi M, Kia EB, Heidari Z, Asgari M, Aryaeipour M, Moradi S, Rokni MB (2013)** Seroprevalence of human fascioliasis in Meshkin-Shahr district, Ardabil Province, northwestern Iran in 2012. *Iran J Parasitol* 8(4):516–521.
33. **Asanji, M.F., Williams, M.O., 1984.** The effect of sex on seasonal variation in single and double infection of cattle in sierra leone by *Dicrocoelium hospes* and *faciola gigantica*. *Vet. Parasitol.* 15, 247–255.
34. **Ashrafi K, ValeroMA, PanovaM, PeriagoMV, Massoud J, Mas-Coma S (2006)** Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan Iran. *Parasitol Int* 55:249–260.
35. **Asrat M.(2004).** Infection prevalence of ovine fasciolosis in irrigation schemes along the Upper Awash River Basin and effects of strategic anthelmintic treatment in selected upstream areas. Master of Science in Biology (Biomedical Science). Université Addis Ababa.
36. **Avise JC. (1986).** Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Trans R Soc Lond* 312: 325-342.
37. **Ayaz, S., Ullah, R., AbdEl-Salam, N. M., Shams, S., & Niaz, S. (2014).** *Fasciola hepatica* in some Buffaloes and cattle by PCR and microscopy. *The Scientific World Journal*, 2014, 462084.

### “B”

38. **Badi, A., (1987).** Contribution à l'étude écologique et éthologique des hôtes intermédiaires de *Dicrocoelium lanceolatum* Rudolphi, 1803 .Mise au point d'une technique de prévision .thèse de Doct .Es-Sci. Nat., Limoges,n°24 , 245p
39. **BaldelliB, D Piergili,Fioretti, M Ambrosi, G.A Polidori, V Grelloni, A Moretti.(1981).** Dicroceliosi ovina: studio degli anticorpi verso *Dicrocoelium dendriticum* in agnelli nati da pecore spontaneamente infette
40. **Baldock FC, Arthur RJ (1985).** Une enquête de la fasciolose chez les bovins de boucherie abattus à des abattoirs dans le sud du Queensland .*Australian Veterinary Journal.* TOM ; 62 (10): 324-6
41. **Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999)** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48.

42. **Bargues M.D, Mangold A.J, Munoz-Antoli C, Pointier J.P, Mas-coma S.(1997).** SU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *Journal of Parasitology*. 83: 1086–1092p. In: Hurtrez-Boussès S, Pendino A, Barnabé C, Durand P, Rondelaud D, Durand C, Meunier C, Hurtrez J.E, Renaud F. 2005. Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Canadian Journal of Zoology*. 83: 1643–1648p.
43. **Bargues MD, Gayo V, Sanchis J, Artigas P, Khoubbane M, Birriel S, Mas-Coma S (2017)** DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005352.
44. **Bargues MD, Horák P, Patzner RA, Pointier J.P, Jackiewicz M, Meier-brook C, MAS-coma S. (2003).** Insights into the relationships of paleartic and nearctic Lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of Stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica* Parasite, 10:243-255p. In: 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. *Bio Med Central Evolutionary Biology*, 10 (381):1417-2148p.
45. **Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-brook C, MAS-COMA S.(2001).** European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*. 1:85-107p
46. **Bargues, M.D., Gayo, V., Sanchis, J., Artigas, P., Khoubbane, M., Birriel, S., Mas-Coma, S., 2017.** DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005352.
47. **Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2001.** European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal

DNA ITS-2 sequences. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 1, 85–107.

48. **Baudin M, D.L.F.D., 2005.** l'Infestation par *Dicrocoelium lanceolatum* dans les élevages de trois cantons en hautesaône, résultats d'une enquête coprologique. École Nationale Veterinaire d'Alfort.

49. **Beesley NJ, Williams DJL, Paterson S, Hodgkinson JE (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.

50. **Beesley, N.J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R.J., Hodgkinson, J.E., Martinez-Moreno, A., Martinez-Valladares, M., Perez, J., Rinaldi, L., Williams, D.J.L., 2018.** *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. Transbound. Emerg. Dis. 65, 199–216.

51. **Belkaid M., Zenaidi N., Bachtta E; Hamrioui B; et Tabet-Derraz O. (1989).** La distomatose hépatique humaine une affection à ne pas méconnaître en Algérie. (A propos des quatre nouveaux cas). Archive de l'Institut Pasteur Alger. 57 : 105-110.

52. **Bennema, S.C., Ducheyne, E., Vercruyssen, 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.

53. **Bennet C.E. (1975).** Scanning electron microscopy of *fasciola hepatica* during growth and maturation in the mouse Journal of Parasitology. 61 : 892-898

54. **Beugnet F. (2000a).** Parasitologie : diagnostic coproscopique en pratique. Action vét., 1510, supplément détachable I à VII.

55. **Beugnet, F. (2000b).** Parasitologie Clinique de bovins. CD ROM. Mérial.

56. **Bhamrah H.S. and Kavita Juneja (1999).** Edited by Balvinder K., Anmol, Reprint, vi.221 p

57. **Bichet H, Jacquet F, Ducos De Lahitte J. (1998).** Estimation du taux de prévalence de la grande douve et de la petite douve en Midi-Pyrénées. Le Point Veterinaire. 29(194), 813-819.

58. **Bihaqi, S.J., Allaie, I.M., Banday, M. a. A., Wani, Z.A., Shahardar, R.A., 2017.** Prevalence of caprine GI helminths in temperate areas of Jammu & Kashmir. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 41, 843–849.
59. **Birgi, E., Graber M. (1969).** Les mollusques pulmonés de la douce basomatophores, vecteurs au Tchad de affections parasitaires du bétail leur élevage au laboratoire. *La Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.* 22 .393-408
60. **Black J, Ntusi N, Stead P, Mayosi B, Mendelson M (2013)** Human fascioliasis in South Africa. *S Afr Med J* 103:658–659
61. **Blaise J, Raccurt CP. (2007).** Hepatobiliary fascioliasis and echinococcosis/hydatidosis in domestic animals in Haiti. *Rev Sci Tech.* 26(3):741-6.
62. **Blaise, J., Raccurt, C.P., 2007.** Hepatobiliary fascioliasis and echinococcosis/hydatidosis in domestic animals in Haiti. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 26, 741–746.
63. **Bobsari, 2005 in Bendiaf Houda,(2011) ;** Contribution . l'étude de la distomatose *Fasciola hepatica* (Linné, 1758) :Aspects parasitologique et sérologique , thèse de Magister en médecine vétérinaire.Universite Mentouri de Constantine - faculte des sciences. P31.
64. **Boissier, J., Grech-Angelini, S., Webster, B.L., Allienne, J.-F., Huyse, T., Mas-Coma, S., Toulza, E., Barré-Cardi, H., Rollinson, D., Kincaid-Smith, J., Oleaga, A., Galinier, R., Foata, J., Rognon, A., Berry, A., Mouahid, G., Henneron, R., Moné, H., Noel, H., Mitta, G., 2016.** Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 971–979.
65. **Boray J. C. (1985).** Flukes of domestic animals In Gaafar S. M., editor; , Howard W. E., editor; , & Marsh R. E., editor. (Eds.), *Parasites, pests and predators* (pp. 179–218). New York: Elsevier.
66. **Boray J.C. (1966).** Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infection with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on adaptation of *Fasciola* spp. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 60: 114–124p. In : Hurtrez-Boussès S, Pendino A, Barnabé C, Durand,P, Rondelaud D, Durand C, Meunier C, Hurtrez J.E and Renaud F. 2005. Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Canadian Journal of Zoology.* 83: 1643–1648p.

67. **Boray, J., Crowfoot, P., Strong, M., Allison, J., Schellenbaum, M., Von Orelli, M., & Sarasin, G. (1983).** Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record*, **113**, 315–317.
68. **Boray, J.C., 1969.** Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.* 7, 95–210.
69. **Boulard A.C. (1996).** Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite.* 3 (3): 209–215p. In: Moreau E, Chauvin A.2010. Immunity against Helminths: Interactions with the Host and the Intercurrent Infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 9p.
70. **Boulard, C., Bouvry, M, Argenté, G. (1985).** Comparaison de la détection des foyers de fasciolose par test ELISA sur lactosérum et sérum et par coproscopie. *Annals of veterinary research.* 16: 363- 368.
71. **Boulard, C., Regnault, A. (1989).** Immunodiagnostic de la fasciolose bovine par la technique ELISA. *Bulletin des Groupement Technique Veterinaire*, 59-68
72. **Bourdeau R., Chermette J., Busserias J. (1983).** Les prélèvements en parasitologie vétérinaire. *Rec. Méd. vét.*, 159, 11, 897-907.
73. **Bourgat, R., Seguin, D., Bayssade-Dufour, C., 1975.** Données nouvelles sur *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907: Anatomie de l'adulte et cycle évolutif: Note préliminaire. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* 50, 701–713.
74. **Boursot, P., & Bonhomme, F. (1986).** Génétique et évolution du génome mitochondrial des Métazoaires. *Genetique, selection, evolution*, 18(1), 73–98. doi:10.1186/1297-9686-18-1-73
75. **Bowles J, Blair D, McManus DP (1992)** Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54:165–173.
76. **Boyce W.M., Courtney C.H., Loggins P.E. (1987).** Resistance to experimental infection with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds and sheep. *International Journal for Parasitology.* **17**, 1233-1237.
77. **Braun U, Gerber D. (1992).** Percutaneous ultrasound-guided cholecystocentesis in cows. *Am. J. Vet. Res.*, Jul; 53 (7), 1079-1084.

78. **Braun U, Wolfensberger R , Hertzberg H (1995).**Diagnosis of liver flukes in cows-a comparison of the findings in the liver, in the feces, and in the bile. *Schweiz. Arch. Tierheilk*, 137, 438-444
79. **Braun, U., Wolfensberger, R., Hertzberg, H., 1995.** Diagnosis of liver flukes in cows--a comparison of the findings in the liver, in the feces, and in the bile. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 137, 438–444.
80. **Brown WM. (1983).** Evolution of animal mitochondrial DNA. *Evolution of genes and proteins.* Sinauer Sunderland, MA 62-88.
81. **Bruns TD, White TJ, Taylor JT. (1991).** Fungal molecular Systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 22: 525-564.
82. **Bussiéras, J., Chermette, R., 1995.** Abr g  de parasitologie vétérinaire , Fascicule III : Helminthologie vétérinaire, 2e  d. ed, Abr g  de parasitologie vétérinaire. Service de parasitologie, Ecole nationale vétérinaire, Maisons-Alfort.

**“C”**

83. **Calamel M (1977).** Application of the technique immunofluorescence, indirect epidemiological study of dicrocoeliose. *Rec Med Vet* 153: 343-348
84. **Campo, R., Manga-González, M., González-Lanza, C., 2000.** Relationship between egg output and parasitic burden in lambs experimentally infected with different doses of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Vet. Parasitol.* 87, 139–149.
85. **Cañete, R., Yong, M., Sánchez, J., Wong, L., Gutiérrez, A., 2004.** Population dynamics of intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* and some environmental factors in San Juan y Martinez municipality, Cuba. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 257–262.
86. **Carnevale S, Malandrini JB, Pantano ML, Soria CC, Rodrigues-Silva R, Machado-Silva JR, Velasquez JN, Kamenetzky L (2017)** First genetic characterization of *Fasciola hepatica* in Argentina by nuclear and mitochondrial gene markers. *Vet Parasitol* 245:34–38.
87. **Cawdery MJ, A Conway.(1971).** Production effects of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, on beef cattle. *Veterinary Record*;89:24\_641-643doi:10.1136/vr.89.24.641.
88. **Cawdery M.J., Strickland K.L., Conway A. ET Crowe P.J. (1977).** Production effects of liver fluke in cattle; the effect of infection on liveweight gain, feed intake and food conversion efficiency in beef cattle . *British Veterinary Journal.*133, 145-159.

89. **Celeb, A.; Ultav, R.(1988).** Losses from livers condemnations from fascioliasis over a year at Carsamba district Abattoir. *Veter. Hekimlik Dergisi*, v.58, p.79-81.
90. **Chaouadi, M., Harhoura, K., Aissi, M., Boutellis, A., Tazerouti, F., 2018.** First abattoir report on bovine dicrocoeliosis from Algiers (Algeria). *Veterinaria* 67, 145–147.
91. **Charlier J., Duchateau L., Claerebout E., Williams D., & Vercruysse J. (2007).** Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, 57–66.
92. **Charlier, J., Soenen, K., De Roeck, E., Hantson, W., Ducheyne, E., Van Coillie, F., De Wulf, R., Hendrickx, G., Vercruysse, J., (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.
93. **Charlier, J., Van der Voort, M., Hogeveen, H., Vercruysse, J., (2012).** ParaCalc®-- a novel tool to evaluate the economic importance of worm infections on the dairy farm. *Vet. Parasitol.* 184, 204–211.
94. **Chauvin A. et Weiyi Huang, IN Lefevre P.C., Jean Blancou et Chermette ED. (2003).** Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail-Europe et régions chaudes-Trématodes hépato-biliaires. p. 1411-1423.
95. **Chauvin A. (2005).** « Grande douve et immunité ».(communication personnelle) Observatoire de la grande douve N° 2 Dec 2005
96. **Chauvin A. (2006).**la sérologie :une méthode de dépistage de choix (communication personnelle) observation de la grande douve ,N° 3
97. **Chauvin, A., Boulard, C. (1996).** Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite* 3 : 209-215
98. **Chauvin, A., Bouvet, G., Boulard, C. (1995).** Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Intern J Parasitol.* 25 : 1227-1241.
99. **Chen MG, Mott KE (1990)** Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Trop Dis Bull* 87:R1–R38

100. **Coghlan A, Tyagi R, Cotton JA, Holroyd N, Rosa BA, Tsai IJ, Laetsch DR, Beech RN, Day TA, Hallsworth-Pepin K, et al (2019)** Comparative genomics of the major parasitic worms. *Nat Genet* 51(1):163–174.
101. **Cordero del Campillo, Miguel; Manga-González, M. Yolanda ; González Lanza, Camino, (1980).** Índice-Catálogo de Zooparasitos Ibéricos. Serv. Publ. Minist. San. Seg. Soc., Madrid, 579 pp.
102. **Cornelissen J.B, DE Leeuw, W.A, Van Der Heijden, P.J. (1992).** Comparison of indirect haemagglutination assay and an ELISA for diagnosis *Fasciola hepatica*. In experimentally and naturally infected sheep. *Vet. Quart*, 4, 152-156
103. **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 Evolutionary Biology*. 10 (381), 1417-2148p.
104. **Courouble F. (2004).** La dicrocœliose bovine en France : observations récentes, prévalence, diagnostic et traitement, communication personnelle.
105. **Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., & Utzinger J. (2010).** FLOTAC: New multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*, 5, 503–515.
106. **Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Malone, J., (2002).** A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. *Vet. Parasitol.* 108, 137–143.
107. **Curtale F., Hammoud E.S., El Wakeel A., Mas-Coma S., Savioli L. (2000)** Human fascioliasis, an emerging public health problem in the Nile Delta, Egypt. *Res Rev Parasitol* 60:129–134
108. **Curtale F., Hassanein YAE, El Wakeel A., Mas-Coma S., Montresore A. (2003a)** Distribution of human fascioliasis by age and gender among rural population in the Nile Delta, Egypt. *J Trop Pediatr* 49:264–268
109. **Curtale F., Mas-Coma S., Hassanein YAE., Barduagni P., Pezzotti P., Savioli L. (2003b)** Clinical signs and household characteristics associated with human fascioliasis among rural population in Egypt: a case-control study. *Parassitologia* 45:5–11

**“D”**

110. **Daniel, R., van Dijk, J., Jenkins, T., Akca, A., Mearns, R., & Williams, D. J. L. (2012).** Composite faecal egg count reduction test to detect resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record*, **171**, 153– 153.
111. **Dargi, J. D. (1975).** Application of radio-isotope techniques to the study of red cell and plasma protein metabolism in helminth diseases of sheep. Symposium of the British Society of Parasitology. 31: 1-26.
112. **Dargie, J. D. (1987).** The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *International Journal for Parasitology*, **17**, 453–463.
113. **Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012)** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9(8):772.
114. **Davies C. ET Goose J. (1991).** Killing of newly excysted juvenile of *Fasciola hepatica* in sensitized rats. *Parasite Immunol.* – **3**, 81-96.
115. **Dawes B. (1970).** Fasciolosis : the invasive stages in animals . *Adv. Parasitol.* – **8**, 259- 274.
116. **Dawes, B., (1968).** The Trematoda. With Special Reference to British and Other European Forms. Cambridge University Press, London.p: 662
117. **DereurE J.(2008).** Bases et principes du diagnostic biologique des helminthoses. 1er cycle – PCEM2 – MB7 – Parasitologie – P4
118. **DeRijk P, Van de Peer Y, Van den Broeck I, De Wachter R. (1995).** Evolution according to large ribosomal subunit RNA. *J Mol Evol* 41: 366-375.
119. **Devall GB. (1984).** Crossed Immunoelectrophoresis in *Methods in Molecular Biology* (part 2) (JM Walker, éd.) pp. 311-316, Humanna Press, Clifton (USA).
120. **Dias, L.M., Silva, R., Viana, H.L., Palhinhas, M., Viana, R.L., 1996.** Biliary fascioliasis: diagnosis, treatment and follow-up by ERCP. *Gastrointest. Endosc.* **43**, 616– 620.
121. **Donnadieu J.D.(2001).** Traitement et prévention de la fasciolose à *Fasciola hepatica* en élevage bovin laitier : essai d’un protocole utilisant le closantel et l’oxyclozanide. Université Paul Sabatier de Toulouse. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, 61 p.

122. **Dorchies P., Franc M. et Luffau G.(1981).** Physiopathologie des strongyloses et de la fasciolose In « Parasitisme digestif et respiratoire des bovins ». Société Française de Buiatrie Ed. Deauville .141-162.
123. **Dorchies, PH., Ducos De Lahitte J., Pangui, L.J., Alzieu, J.-P.(1988).** Recherche de *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceolatum* , *Linguatula denticulata* , dans les foies de bovins saisis à l'abattage de Pamiers. *Rev Med Vet.* 139: 307-309.
124. **Dosay-Akbuluta M, Trudgettb A, Stanhope M (2005)** Understanding genetic diversity of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Z Naturforsch* 60:774–778.
125. **Dow C., Ross J.G. et Todd J.R. (1967).** The pathology of experimental fascioliosis in calves. *J.Comp. Pathol* – **77**, 377-385.
126. **Doy TG, Hughes DL. (1984).** *Fasciola hepatica* : site of resistance to reinfection in cattle. *Exp Parasitol* 57, 274-278
127. **Doy, T.G., Hughes, D.L. (1982).** The role of the thymus in the eosinophil response of rats infected with *Fasciola hepatica*. *Clin Exp Immunol.*47: 74-76
128. **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.
129. **Dreyfuss G, Vignoles P, Abrous M, Rondelaud D. (2002).** Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in Central France. *Parasite.* 9: 113–120p. In : Hurtrez-Boussès S, Pendino A, Barnabé C, Durand P, Rondelaud D, Durand C, Meunier C, Hurtrez J.E, Renaud F. 2005. Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Can. J. Zool.* 83: 1643–1648p
130. **Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. (2003).** Natural infections of *Omphiscola glabra* (Lymnaeidae) with *Fasciola hepatica* in Central France. *Parasitol. Res.* 91:458–461p. In : Hurtrez-Boussès S, Pendino A, Barnabé C, Durand P, Rondelaud D, Durand C, Meunier C, Hurtrez J.E, Renaud F. 2005. Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Can. J. Zool.* 83: 1643–1648p
131. **Ducháček, L., Lamka, J., (2003).** Dicrocoeliosis—the present state of knowledge with respect to wildlife species. *Acta Vet. Brno* 72, 613–626.

132. **Ducommun, D., Pfister, K., (1991).** Prevalence and distribution of *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* infections in cattle in Switzerland. *Parasitol. Res.* 77, 364–366.
133. **Dunn A.M.(1978).** *Veterinary Helminthology*. 2nd Ed. Butler and Tanner, Ltd. London, UK. 15-159p
134. **Dunn M.A.(2003).** Parasitic diseases. In Schiff's Diseases of the Liver. Edited by Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. Philadelphia: LippincottWilliams & Wilkins; 1509–1527p. In: Paul J, Pockros M.D, Thomas A, Capozza M.D.2004. Helminthic Infections of the Liver.*Current Gastroenterology Reports.* 6:287–296p.

**“E”**

135. **El-Rahimy HH, Mahgoub AM, El-Gebaly NSM, Mousa WM, Antably AS (2012).** Molecular, biochemical, and morphometric characterization of *Fasciola* species potentially causing zoonotic disease in Egypt. *Parasitol Res* 111(3):1103–1111.
136. **El-Shazly, A.M., el-Wafa, S.A., Haridy, F.M., Soliman, M., Rifaat, M.M.A., Morsy, T.A., (2002).** Fascioliasis among live and slaughtered animals in nine centers of Dakahlia Governorate. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 32, 47–57.
137. **Eltahawy AS, Bazh EK, Khalafalla RE (2017)** Epidemiology of bovine fascioliasis in the Nile Delta region of Egypt: Its prevalence, evaluation of risk factors, and its economic significance. *Vet World* 10(10):1241–1249.
138. **Esteban JG, Gonzalez C, Curtale F, Muñoz-Antoli C, Valero MA, Bargues MD, El-Sayed M, El-Wakeel AA, Abdel-Wahab Y, Montresor A, Engels D, Savioli L, Mas-Coma S (2003)** Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages of the Nile Delta, Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 69:429–437
139. **Euzeby.J. (1971a).** Les fascioloses hépatobiliaires des ruminants domestiques. *Cah.Med.Vet*, 401, 249-256.
140. **Euzeby J. (1971b).** Distomatoses hépto-biliaires in : Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la santé humaine. Tome II, Livre 1, Paris ; Vigot Frères Editeurs, 299-618.
141. **Euzeby J. (1998).** Parasite des viandes : épidémiologie physiologie incidence zoonosique. Lavoisier Tec et doc, Paris.324-335p.

142. **Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005)** Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinforma* 1:47–50

**“F”**

143. **Fabre J, Boutinet C, Lifermann F.(2001)**. Pneumothorax au cours d’une distomatose. *Presse Med.* 30:1587–1488p. In : Andriamanantena P, Rey P, Perret J.L, Klotz. F.2005. Distomatoses. EMC-Maladies Infectieuses 2. Elsevier, France.105–118p.

144. **Faria, R.N., Cury, M.C., Lima, W.S., (2005)**. Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in Brazilian cattles. *Rev Med Vet* 156, 85–86.

145. **Farjallah S, Ben Slimane B, Piras CM, Amor N, Garippa G, Merella P (2013)** Molecular characterization of *Fasciola hepatica* from Sardinia based on sequence analysis of genomic and mitochondrial gene markers. *Exp Parasitol* 135:471–478.

146. **Farjallah, S., Sanna, D., Amor, N., Ben Mehel, B., Piras, M.C., Merella, P., Casu, M., Curini-Galletti, M., Said, K., Garippa, G., (2009)**. Genetic characterization of *Fasciola hepatica* from Tunisia and Algeria based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Parasitol. Res.* 105, 1617–1621.

147. **Fasanella, A., Lia, R., Giangaspero, A., (1995)**. *Cerņuella virgata* (Mollusca : Gastropoda : Pulmonata) hôte intermédiaire de *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) dans la région de Puglia, Italie. *Parasite* 2, 331–333.

148. **Fitch WM. (1970)**. Toward defining the tree of maximum parsimony. In Estabrook GF (eds), Francisco, 160-178.

149. **Flanagan A., Edgar H. W. J., Gordon A., Hanna R. E. B., Brennan G. P., & Fairweather I. (2011)**. Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 176, 170–176

150. **Foreyt W. J. (2001)**. *Veterinary parasitology reference manual*. Ames, IA: Iowa State University Press; London: Eurospan.

151. **Fu YX (1997)** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

152. **Fuentes, M.V., Malone, J.B., Mas-Coma, S., (2001).** Validation of a mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Trop.* 79, 87–95.

153. **Fuentes, M.V., Valero, M.A., Bargues, M.D., Esteban, J.G., Angles, R., Mas-Coma, S., (1999).** Analysis of climatic data and forecast indices for human fascioliasis at very high altitude. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93, 835–850.

### “G”

154. **Gaasenbeek, C. P. H., Moll, L., Cornelissen, J. B. W. J., Vellema, P., & Borgsteede, F. H. M. (2001).** An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, **95**, 37– 43.

155. **Gabli A, Agabou A, Gabli Z (2015)** Brucellosis in nomadic pastoralists and their goats in two provinces of the eastern Algerian high plateaus. *Trop Anim Health Prod* 47(6):1043–1048.

156. **Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996)** SeaView and Phylowin, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543–548.

157. **Gimard, G. (2001).** Fasciolose bovine : enquête Epidémiologique en abattoir et Évaluation de la sensibilité des tests sérologiques. *Thèse med. vet. Nantes*, n°114, 96.

158. **González-Lanza, C., Manga-González, M.Y., Campo, R., Del-Pozo, P., Sandoval, H., Oleaga, A., Ramajo, V., (2000).** IgG antibody response to ES or somatic antigens of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. *Parasitol. Res.* 86, 472–479.

159. **González-Lanza, C., Manga-González, M.Y., Del-Pozo-Carnero, P., (1993).** Coprological study of the *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in León Province, northwest Spain. *Parasitol. Res.* 79, 488–491.

160. **Gordon, D., Zadoks, R., Skuce, P., & Sargison, N. (2012).** Confirmation of triclabendazole resistance in liver fluke in the UK: FIG 1. *Veterinary Record*, **171**, 159–160.

161. **Grabar P, C Williams. (1953).** Application of immunoelectrophoresis to the separation of proteins. *Biochimica et Biophysica. Acta* 10:193-4

162. **Graber, M., Birgi, E., (1969).** Mollusques pulmonés d'eau douce basommatophores, vecteurs au Tchad d'affections parasitaires du bétail: leur élevage au laboratoire. *Rev. Délevage Médecine Vét. Pays Trop.* 22, 393–408.
163. **Graczyk T.K., Fried B.(1999).** Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. In : Hurtrez-Boussès S, Pendino A, Barnabé C, Durand P, Rondelaud D, Durand C, Meunier C, Hurtrez J.E and Renaud F. 2005. Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Canadian Journal of Zoology.* 83: 1643–1648p.
164. **GrantWS, Bowen BW (1998)** Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights for sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered* 89:415–426.
165. **Gross W, W März .(1988).** Immunoelectrophoretic techniques in protein analysis and quantitation. *American Biotechnology Laboratory* .6(2):6-19.
166. **Gürelli, G., 2017.** Importance of Land Snails in Dicrocoeliosis Epidemiology. *Turk. Parazitoloji Derg.* 41, 169–172.

#### “H”

167. **Hamed N, Ayadi A, Hammami H (2014)** Epidemiological studies on fasciolosis in northern Tunisia. *Revue Méd Vét* 165(1–2):49–56.
168. **Hamrioui B., Belkaid M., Oussalah S. and Tabetderraz O. (1980).**Un nouveau cas de distomatose hépatique en Algérie. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* , 54: 94-96.
169. **Hanna R.E.(1980a).** *Fasciola hepatica* an immunofluorescence study of antigenic changes in the tegument during developpement in the rat and the sheep. *Experimental Parasitology.* 50: 297- 304
170. **Hanna R.E.(1980b).***Fasciola hepatica* autoradiography of protein synthesis , transport and secretion by the tegument. *Experimental Parasitology.* 50: 103-114
171. **Hanna R.E.(1980c).** *Fasciola hepatica* glycoalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. . *Experimental Parasitology.* 50: 103- 114
172. **Hanna, R. E. B., McMahon, C., Ellison, S., Edgar, H. W., Kajugu, P. E., Gordon, A., Fairweather, I. (2015).** *Fasciola hepatica*: A comparative survey of adult

fluke resistance to triclabendazole, nitroxynil and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. *Veterinary Parasitology*, **207**, 34– 43.

173. **Haroun E. T. M. ET Hillyer G.V. (1986)**. Resistance to fascioliasis : a review. *Veterinary Parasitology*. **20**, 63-93.

174. **Haseeb AN, El Shazly AM, Arafa MAS, Morsy AT (2002)** A review on fascioliasis in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 32:317–335

175. **Hassan, M.M., Saad, M., Hegab, M.H., Metwally, S., (2001)**. Evaluation of circulating *Fasciola* antigens in specific diagnosis of fascioliasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 31, 271–279.

176. **Hayashi K, Ichikawa-Seki M, Mohanta UK, Singh TS, Shoriki T, Sugiyama H, Itagaki T (2015)** Molecular phylogenetic analysis of *Fasciola* flukes from eastern India. *Parasitol Int* 64:334–338.

177. **Hayashi K, Mohanta UK, Neeraja T, Itagaki T (2016)** Molecular characterization of *Fasciola gigantica* in Delhi, India and its phylogenetic relation to the species from South Asian countries. *J Vet Med Sci* 78(9):1529–1532

178. **Hazlett, M., Stalker, M., Lake, M., Peregrine, A., 2018**. Hepatic *Dicrocoelium dendriticum* infection in a miniature horse. *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire Can.* 59, 863–865.

179. **Hazoug-Boehm E., Chaker E., Abdi A., Molet B., Kien T.T. and Kremer M. (1979)**. La distomatose á *Fasciola hepatica* dans le Maghreb. A propos de deux cas algériens nouveaux. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* , 56: 105-116

180. **Henson JM, French R. (1993)**. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann Rev Phytopath* 31: 81-109.

181. **Himonas, C.A., Liakos, V., (1980)**. Efficacy of albendazole against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet. Rec.* 107, 288–289.

182. **Hohorst, W., Laemmler, G., 1962**. [Experimental studies on dicrocoeliasis]. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 13, 377–397.

**“I”**

183. **Ichikawa-Seki M, Ortiz P, Cabrera M, Hobán C, Itagaki T (2016)** Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola hepatica* from Peru. *Parasitol Int* 65(3):171–174.
184. **Ichikawa-Seki M, Peng M, Hayashi K, Shoriki T, Mohanta UK, Shibahara T, Itagaki T (2017)** Nuclear and mitochondrial DNA analysis reveals that hybridization between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* occurred in China. *Parasitology* 144:206–213.
185. **IrfanUllah, Muhammad Farrukh Nisar, Ammad Ali Khan Jadoon and Sobia Tabassum;(2016)**. Prevalence of *Fasciola hepatica* in Domesticated Cattle of District Karak, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan .*Asian Journal of Animal Sciences* 10 (1): 85-91
186. **Irfan-ur-Rauf Tak, Jehangir Shafi Dar, B. A. Ganai , M. Z. Chishti, R. A. Shahardar, Towsief, Ahmad Tantry, Masarat Nizam and Shoaib Ali Dar (2014)** Comparative analysis of different immunological techniques for diagnosing fasciolosis in sheep: A review. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 9, 21–25.
187. **Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo J, Terasaki K, Shibahara T, Fukuda K (2005)** Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology* 131(05):679–685.

**“J”**

188. **Jabbour-Zahab R, Pointier J.P, Jourdane J, Jarne P, Oviedo J.A, Bargues M.D, MAS Coma S, Anglés R, Perera G, Balzan C. (1997)**. Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*.64:191-203p.
189. **Jacquet P., Dorchie P.(2002)**.Les outils du diagnostic parasitologique : étude analytique, critique et prospective. Proceedings du congrès sur « de l’animal au troupeau, du troupeau à l’animal », *Journées nationales des Groupements Techniques Vétérinaires*, Tours, 29 au 30 mai 2002, 479-488.

190. **Januszkiewicz K, Norbury LJ, P Wilkowski, Zawistowska-Deniziak A, Wesolowska A, Wedrychowicz H (2015).** Variations in cercarial production and the level of in vitro activation of metacercariae of two different isolates of *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitologica* 60(3): 509–514.
191. **Jean-Richard, V., 2015.** Crowding at Lake Chad : an integrated approach to demographic and health surveillance of mobile pastoralists and their animals (Thesis). University\_of\_Basel.
192. **Jemli MH, Rhimi I, Jdidi A, Mastouri L & Kilani M.(1991).**La fasciolose ovine dans la région de Sejnane (nord de la Tunisie). *Rev Méd Vét* , 142, 229-235
193. **Jithendran, K.P., Bhat, T.K., (1996).** Prevalence of dicrocoeliosis in sheep and goats in Himachal Pradesh, India. *Vet. Parasitol.* 61, 265–271.
194. **Juliard ,R (2003).**La Dicrocoeliose bovine: influence du parasitisme sur l'albuminémie. Thèse Méd. Vét, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, Lyon, 116, 112 p
195. **Juracek, V, Dubinsky, P (1993)** *Veterinarna parazitologia. Priroda*, Bratislava, p. 382

### “K”

196. **Kardjadj M (2018)** History of Foot-and-mouth disease in North African countries. *Vet Ital* 54(1):1–12.
197. **Kaufmann J.(1996).** Parasitic infections of domestic animals: a diagnostic manual. Basel; Boston; Berlin: Birkhauser.verlag, Basel-Boston-Berlin 88y 319.
198. **Keiser J, Jürg U .(2007).** Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. Volume 23, Issue 11, p555–562.
199. **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 in Parasitology*, 32, 458– 469.
200. **Kendall S.B.(1954).** Fascioliasis in Pakistan. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* . 48: 307-313p.
201. **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.

202. **Knapp SE, Dunkel AM, Han K, Zimmerman (1992).** LA Epizootiology of fascioliasis in Montana. *Veterinary Parasitology*. 42(3-4):241-6.
203. **Koç, Z., Uluşan, S., Tokmak, N., (2009).** Hepatobiliary fascioliasis: imaging characteristics with a new finding. *Diagn. Interv. Radiol. Ank. Turk.* 15, 247–251.
204. **Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. (1989).** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved amorces. *Proc Nat Sci* 86: 6196-6200.
205. **Krull, W.H., (1958).** The migratory route of the metacercaria of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 in the definitive host: *Dicrocoelidae*. *Cornell Vet.* 48, 17–24.
206. **Krull, W.H., Mapes, C.R., (1952).** Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) looss, 1899 (Trematoda: *Dicrocoeliidae*), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). VII. The second intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum*. *Cornell Vet.* 42, 603–604.
207. **Kuerpick B., Schnieder T., & Strube C. (2013).** Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica* . *Veterinary Parasitology*, 193, 206–213.

### “L”

208. **Labruna MB, Costa F, Port-Carvalho M, Oliveira A, Souza S, Castro M (2018)** Lethal fascioliasis in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *J Parasitol* 104(2):173–176.
209. **Lafay E. ET Mage C. (1976)** Valeur de la coproscopie parasitaire dans le dépistage de la fasciolose bovine. –Rapports et Résumés IXème Congrès International sur les Maladies du Bétail, Société Mondiale de Buiatrie, éd. Paris – 2,1105-1112.
210. **Le Net J.L., Courouble F., Besognet B. (2005).** Lésions hépatiques induites par *Dicrocoelium dentriticum* dans l’espèce bovine. In *Comptes Rendus des journées nationales des GTV*, Nantes, 25-27 mai 2005, philippe.camuset, éditeur. 908.
211. **Le TH, Blair D, Agatsuma T, Humair PF, Campbell NJ, Iwagami M, Littlewood DT, Peacock B, Johnston DA, Bartley J, Rollinson D, Herniou EA,**

**Zarlenga DS, McManus DP (2000)** Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders—a cautionary tale from the parasitic flatworms. *Mol Biol Evol* 17(7):1123–1125.

212. **Le TH, Nguyen KT, Nguyen NT, Doan HT, Le XT, Hoang CT, De NV (2012)** Development and evaluation of a single-step duplex PCR for simultaneous detection of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (family Fasciolidae, class Trematoda, phylum Platyhelminthes). *J Clin Microbiol* 50:2720–2726.

213. **Le, T.H., Nguyen, K.T., Nguyen, N. T. B., Doan, H.T.T., Le, X.T.K., Hoang, C. T. M., & De, N. V. (2012).** Development and evaluation of a single-step duplex PCR for Simultaneous detection of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (Family Fasciolidae, Class Trematoda, Phylum Platyhelminthes). *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 2720–2726.

214. **Lecointre G, Philippe H, Lê HLV, Le Guyader H. (1993).** Species sampling has a major impact on phylogenetic inference. *Mol Phylog Evol* 2: 205-224.

215. **Lecointre G. (1993).** Etude de l'impact de l'échantillonnage des espèces et de la longueur des

216. **Leimbacher F, Rondelaud J, Marel C.(1972).** L'hôte intermédiaire de la grande douve en France. Institut technique de l'élevage ovin et caprin <Parigi>; Federation nationale Ovine. Imprimerie Louis-Jean

217. **Letonturier, P., (2007).** Immunologie générale | Elsevier Masson, 8ème édition. ed. MASSON.

218. **Levasseur (G.) (2009)** -La dicrocoeliose bovine : suivi de l'excrétion pendant l'hiver. *Bulletin* Librado P, Rozas J DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451–1452.

219. **Levasseur G, (2002)**-La dicrocoeliose bovine : suivi de l'excrétion pendant l'hiver. *Bulletin des GTV*, 2002, 13, 137-139.

220. **Levieux, D., Levieux, A., Mage, C., Garel, J.- P. (1992a).** Immunological detection of chemotherapeutic success in bovine fasciolosis using the specific antigen f2. *Veterinary Parasitology*. 45: 81-88.

221. **Levieux, D., Levieux, A., Venien, A. (1992b).** An improved passive hemagglutination test for the serological diagnosis of bovine fasciolosis using the specific antigen f2. *Veterinary Parasitology*. 42: 53-66

222. **Lewin B. (1994).** Ribosomes provide a translation factory, chap 9. Tiré de Gene V. Oxford
223. **Lievre H.(1932).** La répartition de la distomatose algérienne et ses variations. Thèse Doct. Médecine, Alger, 1932, 44 p.
224. **Liu GH, Gasser RB, Young ND, Song HQ, Ai L, Zhu XQ (2014)** Complete mitochondrial genomes of the ‘intermediate form’ of *Fasciola* and *Fasciola gigantica*, and their comparison with *F. hepatica*. *Parasit Vectors* 7(1):150.
225. **Looss A, (1907).** Notizen zur Helminthologie Aegyptens. VII. Ueber einige neue Trematoden der aegyptischen Fauna. *Ctbl. F. Bakt. I Abt. Orig.*, 43, 478-490.
226. **LotfyWM, Brant SV, DeJong RJ, Le TH, Demiaszkiewicz A, Rajapakse RP, Perera VB, Laursen JR, Loker ES (2008)** Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *Am J Trop Med Hyg* 79(2):248–255.

**“M”**

227. **Mage C., Legarto. (1986).** Etude de l’incidence d’un traitement contre la grande douve sur la production laitière. Institut Technique de l’Elevage Bovin. 86112 : 13p.
228. **Mage C., LOISEL J, BONNAND P. (1989).** Infestation par *Fasciola hepatica* et fécondité en élevage laitier. *Rev.Med.Vét.*140(10) :929-931p. In : Donnadieu J.D. 2001. Traitement et prévention de la fasciolose à *Fasciola hepatica* en élevage bovin laitier : essai d’un protocole utilisant le closantel et l’oxyclozanide. Grade de Docteur vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse : Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, 2001,61p.
229. **Mage C. (1989).** Epidémiologie de l’infestation par *Fasciola hepatica* chez les bovins en Limousin. *Revue de Médecine Vétérinaire.* 140 5, 407-411.
230. **Mage C., Bourgne H., Toullieu J.M., Rondelaud D. & Dreyfuss G., (2002).** *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Veterinary Research* .33, 439-447.
231. **Mage C. (1988).** Contribution à l’Étude de la fasciolose à *Fasciola hepatica* LinnÉ des bovins allaitants dans le Limousin et la Cerdagne (France) conséquences zootechniques et essais thérapeutiques. These doct. univ. Limoges. France, 136

232. **Mage C. (2002).** La semaine vétérinaire, *CEVA, santé animale* Ismail N.M. et Haroun N.H. (2001). Effect of various food on *Biomphalaria alexandrina* *Bulinus truncatus* and their susceptibility to schistosome miracidia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 3 : 939-952.
233. **Mage C. (2008).** Parasites des moutons. Diagnostic et traitement. 2ème édition. France agricole.
234. **Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., Cabanas, E., Campo, R., (2001)** Contributions to and review of *Dicrocoeliosis*, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitology* 123, 91–114.
235. **Manga-Gonzalez, M.Y., Gonzalez-Lanza, C., Del-Pozo-Carnero, P., (1991).** Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in the Porma basin (León, NW Spain). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66, 57–61.
236. **Marie Rieu, A.E., (2004).** paramphistomoses gastroduodénales bovines : Enquête épidémiologique en Champagne-Ardenne et mise au point d'un test E.L.I.S.A. pour la détection de coproantigènes parasitaires (PhD Thesis). Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Créteil: École Nationale Vétérinaire d'Alfort.
237. **Martínez-Valladares M, Rojo-Vázquez FA (2014)** Intraspecific mitochondrial DNA variation of *Fasciola hepatica* eggs from sheep with different level of anthelmintic resistance. *Parasitol Res* 113(7): 2733–2741
238. **Mas Coma S., Bargues MD, (1997).** Human liver flukes: A review. *Res Rev Parasitol* 57: 145–218.
239. **Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG (1999a)** Human fasciolosis. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*. CAB International, Oxon, pp 411–434
240. **Mas-Coma S, Bargues MD, Marty AM, Marty AM, Neafie RC (2000)** Hepatic trematodiasis. In: Meyers WM, Neafie AM, Marty AM, Wear DJ (eds) *Pathology of infectious diseases, Helminthiasis*, vol 1. Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washington, DC, pp 69–92
241. **Mas-Coma S, Bargues MD (1997)** Human liver flukes: a review. *Res Rev Parasitol* 57:145–218.

242. **Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009a)** Chapter 2. Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 69:41–146
243. **Mas-Coma, M.S., Esteban, J.G., Bargues, M.D., (1999b)**. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull. World Health Organ.* 77, 340–346.
244. **Mas-Coma, S., (2004)**. Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35, 1–11.
245. **Mas-Coma, S., Rodriguez, A., Bargues, M.D., Valero, M.A., Coello, J.R., 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.
246. **Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., (2008)**. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 27, 443–457.
247. **Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., (2009b)**. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet. Parasitol.* 163, 264–280.
248. **Mattes, O., 1936**. Der Entwicklungsgang des Lanzettegels *Dicrocoelium Lanceatum*. *Z. Für Parasitenkd.* 8, 371–430.
249. **Maurelli, M.P., Rinaldi, L., Capuano, F., Perugini, A.G., Veneziano, V., Cringoli, G., 2007**. Characterization of the 28S and the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium hospes*. *Parasitol. Res.* 101, 1251–1255.
250. **McDougall, H.C., 2012**. Identifying “hidden” antigens in the liver fluke, *Fasciola hepatica* (PhD Thesis). University of Glasgow.
251. **Meek, A.H., Morris, R.S., 1979**. An epidemiological investigation of ovine fascioliasis (*Fasciola hepatica*) on both irrigated and non irrigated pastures in northern Victoria. *Aust. Vet. J.* 55, 365–369.

252. **Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, Saleem MH, Rehman MU, Iqbal MK, Wang Y, Ahmad HI, Abbas T, Hussain R, Ghorri MT, Ali S, Khan AU, Li J (2017)** A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog* 109:253–262
253. **Meissonnier E, Mage C (2007)** Methods of detection of *Fasciola hepatica* in cattle in France. *Bull Acad Vét France* 160:395–406
254. **Mekroud A, Benakhla A, Vignoles P.(2004).** Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep and the host snail (*Galba truncatula*) in northeastern Algeria. *Parasitology Research*; **92** : 502-505.
255. **Mekroud A., Titi A., Benakhla A., Rondelaud D.(2006).** The proportion of liver excised in Algerian abattoirs is not a good indicator of *Fasciola hepatica* infections in local cattle breeds. *Journal of Helminthology*, **80**, 319–321
256. **Meunier-Salaün, M. C. ; Edwards, S. A. ; Robert, S., (2001).** Effect of dietary fibre on the behaviour and health of the restricted fed sow. *Animal Feed Science and Technology*. 90 (1-2): 53-69
257. **Meyer C., ed. sc., 2020,** Dictionnaire des Sciences Animales. [On line]. Montpellier, France, Cirad. [11/02/2020]. <URL : <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/> >
258. **Moazeni M, Sharifiyazdi H, Izadpanah A (2012)** Characterization of *Fasciola hepatica* genotypes from cattle and sheep in Iran using cytochrome C oxidase gene (CO1). *Parasitol Res* 110:2379–2384.
259. **Moazeni, M., Ahmadi, A., (2016).** Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 169, 81–89.
260. **Molloy, J.B., Anderson, G.R., (2006).** The distribution of *Fasciola hepatica* in Queensland, Australia, and the potential impact of introduced snail intermediate hosts. *Vet. Parasitol.* 137, 62–66.
261. **Moreau E, Chauvin A, Boulard C.(1997).** Interactions hôte-parasite au cours de la fasciolose à *Fasciola hepatica* chez les ruminants. *Le Point Vétérinaire.*, 28, 1827-1834.
262. **Moreau, E. and Chauvin, A. (2010)** Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi:10.1155/2010/428593

263. **Moulinier, C., (2002).** Parasitologie et mycologie médicales Éléments de morphologie et de biologie -. Edition Medical International.293-304.
264. **Mucheka VT, Lamb JM, Pfukenyi DM, Mukaratirwa S (2015)** DNA sequence analyses reveal co-occurrence of novel genotypes of *Fasciola gigantica* (Fasciolidae; Echinostomida; Trematoda) with *F. hepatica* in South Africa and Zimbabwe. *Vet Parasitol* 214(1– 2):144–151
265. **Müller, Otto Frederik, (1773).** Vermivm terrestrium et fluviatilium, seu, Animalium infusoriorum, helminthicorum et testaceorum, non marinorum, succincta historia. apud Heineck et Faber :, et Lipsiae : v.1 (1773-1774)
266. **Malek, E.A. (1980).** Snail-transmitted parasitic diseases. Volume II. CRC Press Inc., Florida.
267. Martínez-Pérez J. M., Robles-Pérez D., Rojo-Vázquez F. A., & Martínez-Valladares M. (2014). Immunological features of LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* . *Research in Veterinary Science*, 97, 329–332.
268. **Martínez-Pérez, J. M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F. A., & Martínez-Valladares, M. (2012).** Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, **190**, 80– 86.
269. **Martínez-Valladares, M., & Rojo-Vázquez, F. A. (2016).** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions. *Parasites & Vectors*, **9**, 73– 77.
270. **McManus, D. P., & Dalton, J. P. (2006).** Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology*, **133**, S43.
271. **Meemon, K., & Sobhon, P. (2016).** Development of fasciola vaccine in an animal model. In Thomas, S. (Ed.), *Vaccine design* (pp. 123–133). New York: Springer.
272. **Mezo M., González-Warleta M., Castro-Hermida J. A., Muiño L., & Ubeira F. M. (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. *Parasitology International*, 59, 610–615

273. **Mitchell, G. B., Maris, L., & Bonniwell, M. A. (1998).** Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary Record*, **143**, 399.
274. **Molina-Hernandez, V., Mulcahy, G., Perez, J., Martinez-Moreno, A., Donnelly, S., O'Neill, S. M.,...Cwiklinski, K. (2015).** Fasciola hepaticavaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary Parasitology*, **208**, 101–111.
275. **Moll, L., Gaasenbeek, C. P. H., Vellema, P., & Borgsteede, F. H. M. (2000).** Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, **91**, 153– 158.
276. **Mooney, L., Good, B., Hanrahan, J. P., Mulcahy, G., & de Waal, T. (2009).** The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*, **164**, 201– 205.

**“N”**

277. **Naeemipour, M., Hashemitabar, G.R., Dastjerdi, K., Mojaver, M.J., Mohammadi, H.R.,(2016).** Comparison of Fecal Egg Counts and ELISA for the Diagnosis of Dicrocoelium Dendriticum Infection. *Pol. J. Vet. Sci.* **19**, 573–580.
278. **Neuhaus, W., (1936).** Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Lanzettegel-Cercarie (*Cercaria Vitrina*) und Klarstellung des Infektionsvorganges beim Endwirt. *Z. Für Parasitenkd.* **8**, 431–473.
279. **Notomi, T. (2000).** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **28**, 63e– 63.
280. **Nozais, J.-P., Datry, A., Dani, M., (1996).** *Traité de parasitologie médicale.* Ed. Pradelparis 817p21.
281. **Nyindo M, Lukambagire AH (2015)** Fascioliasis: an ongoing zoonotic trematode infection. *Biomed Res Int* **2015**:1–8.

**“O”**

282. **Oakley, G.A. ; Owen, B. ; Knapp, N.H.(1979).** Production effects of subclinical liver fluke infection in growing dairy heifers. *Veterinary Record*. 104(22):503-7.
283. **Ohari Y, Hayashi K, Mohanta UK, Kuwahara Y, Itagaki T (2017)** First report of *Fasciola* larva infection in *Galba truncatula* (Muller, 1774) (Gastropoda, Lymnaeidae) occurring in the natural environment in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 79(8):1381–1383
284. **Olsen GJ. (1987).** Earliest Phylogenetic branchings: comparing ARNr-based evolutionary trees inferred with various techniques. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 52:825-37
285. **Omar MA, Metwally AM, Sultan K (2013)** Molecular and phylogenetic status of *Fasciola* sp., of cattle in Qena, Upper Egypt Pak. *J Biol Sci* 16(15):726–730
286. **Onar, E., (1990).** Efficacy of thiophanate and albendazole against natural infections of *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica*, and gastrointestinal nematodes and cestodes in sheep. *Vet. Parasitol.* 35, 139–145
287. **Otranto, D., Rehbein, S., Weigl, S., Cantacessi, C., Parisi, A., Lia, R.P., Olson, P.D., (2007).** Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Trop.* 104, 91–98.
288. **Otranto, D., Rehbein, S., Weigl, S., Cantacessi, C., Parisi, A., Lia, R.P., Olson, P.D., (2007).** Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Trop.* 104, 91–98.
289. **Otranto, D., Traversa, D., (2002).** A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.* 107, 317–335.
290. **Otranto, D., Traversa, D., 2003.** Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends Parasitol.* 19, 12–15.

291. **Ouchene-Khelifi NA, Ouchene N, Dahmani H, Dahmani A, Sadi M, Douifi M (2018)** Fasciolosis due to *Fasciola hepatica* in ruminants in abattoirs and its economic impact in two regions in Algeria. *Trop Biomed* 35(1):181–187
292. **Overend, D. J., & Bowen, F. L. (1995).** Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal*, **72**, 275– 276.

**“P”**

293. **Peng M, Ichinomiya M, Ohtori M, Ichikawa M, Shibahara T, Itagaki T (2009)** Molecular characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol Res* 105(3):809–815
294. **Persan, J.M.(1974).** Le diagnostic immunobiologique de la fasciolose bovine. Application de la méthode d'I.F.I. Thèse Méd. Vêt. Alfort N°46.
295. **Piergili Fioretti, D., Baldelli, B., Ambrosi, M., Polidori, G.A. & Moretti, A. (1980).** Il metodo ELISA per la ricerca di anticorpi in ovini parassitati da *Dicrocoelium dendriticum*. *Riv. Parassitol.*, 3: 289–292.
296. **Pourquier, PH., Caquineau, L., Galaup, M., LE Moal, Y., Martain, L., Salingardes, F., Turmel, R.(1995).**Evaluation de l’infestation naturelle de cheptels bovins par *Fasciola hepatica* d’après le titrage d’anticorps du sang ou du lait avec un réactif ELISA utilisant l’antigène spécifique F2. *Bulletin mensuel de la Société Vétérinaire Pratique* . 79: 285-307
297. **Pybus, M.J., (2001).** Parasitic diseases of wild mammals, 2nd ed. ed. Iowa State University Press, Ames.

**“R”**

298. **Radfar MH, Nourollahi-Fard SR, Mohammadyari N.(2015).** Bovine fasciolosis: prevalence, relationship between faecal egg count and worm burden and its economic impact due to liver condemnation at Rudsar abattoir, Northern Iran. *J Parasit Dis.* 2015 Sep;39(3):522-5.
299. **Rapsch, C., Schweitzer, G., Grimm, F., Kohler, L., Bauer, C., Deplazes, P., Braun, U., Togerson, P.R. (2006).** Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in

cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *The International Journal for Parasitology* . 36: 1153-1158.

300. **Rehbein, S., Kokott, S., Lindner, T., 1999.** Evaluation of techniques for the enumeration of *Dicrocoelium* eggs in sheep faeces. *Zentralbl. Veterinarmed. A* 46, 133–139.

301. **Reichel, M.P., Vanhoff, K., Baxter, B. (2005).** Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle *Veterinary Parasitology*. 129: 61-66

302. **Relf, V., Good, B., Hanrahan, J.P., McCarthy, E., Forbes, A.B., deWaal, T., 2011.** Temporal studies on *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* in the west of Ireland. *Vet. Parasitol.* 175, 287–292.

303. **Remigio E.A. (2002).** Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus *Lymnaea*, the intermediate host of the causative agent of fascioliasis: insights from broader taxon sampling. *Parasitology Research*. 88:687-696p .

304. **Righi S, Benakhla A, Mekroud A, Ouchene N, Sedraoui S (2016)** Prevalence of *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* detected by multiplex PCR in the province of El Tarf (Algeria). *Trop Biomed* 33:149–158

305. **Rippert C., Lallane J ; Giap G.ET Gefard D. (1998).** Epidemiologie des maladies parasitaires protozooses et helminthoses reservoirs ,vecteurs de transmission. Tome II : Les helminthoses.p :117-137,p562.

306. **Roberts E.W.(1950).** Studies on the life cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Limnaea (Galba) truncatula* (Muller) in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 44 : 187-206p. In : Saint Guillain M. 1968. Etude histologique des premiers stades évolutifs de *Fasciola hepatica* L. *Acta Zoologica et Pathologica Antiverpiensia*. 46 : 77-132p.

307. **Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J. M., Rojo-Vázquez, F. A., & Martínez-Valladares, M. (2013).** The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected. *Veterinary Parasitology*, **197**, 277– 282.

308. **Rojo Vazquez, F., Cordero del Campillo, M., Diez Banos, P., Chaton Schaffner, M., (1981).** Relationship existing between the number of eggs in the feces and

the parasitic charge during ovine natural *Dicrocoelium dentriticum* infestations. *Rev Med. Vet.* 1981; 132, 601– 607

309. **Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M., (2012).** Update on trematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 189, 15–38.

310. **Rokni M, Mirhendi H, BehniaM, Jalalizand N (2010).** Molecular characterization of *Fasciola hepatica* isolates byRAPD-PCR and ribosomal ITS1 sequencing. *Iran Red Crescent Med J* 2010(1):27–32

311. **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. *Journal of Parasitology Research.* 87: 475–478p.

312. **Rondelaud, D., Hourdin, P., Vignoles, P., Dreyfuss, G., Abrous, M., (2017).** *Galba truncatula* (Lymnaeidae): la colonisation de l’habitat au cours de l’année et la dynamique des générations annuelles chez deux populations vivant sur des berges de rivière en amont d’un barrage. *Ann. Sci. Limousin* 16, 34–47.

313. **Rondelaud, D., Hourdin, P., Vignoles, P., Dreyfuss, G., Cabaret, J., (2011).** The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. *Vet. Parasitol.* 181, 166–173.

314. **Rondelaud, D., Vignoles, P., Hourdin, P., Dreyfuss, G., (2008).** Les générations annuelles de *Galba truncatula* (Mollusca, Lymnaeidae) dans le département de la Haute-Vienne. *Ann. Sci. Limousin* 19, 21–31.

315. **Ross, J. G. (1970)** The economics of *Fasciola hepatica* infection in cattle *Br. The Veterinary Journal.* 126 p.

316. **Rouhani S, Raeghi S, Spotin A (2017)** Spermatogenic and phylomolecular characterizations of isolated *Fasciola* Spp. from Cattle, North West Iran. *Pak J Biol Sci* 20(4):204–209.

317. **Roy B. ET Tandon V . (1992).** Seasonal prevalence of some zoonotic trematode infections in cattle and pigs in the north-east montane zone in India. *Veterinary Parasitology.* 41: 69-76.

318. **Ryan E.T, Wilson M.E, Kain K.C. (2002).** Illness after international travel. *N.Engl. J. Med.* 347:505–516p. In: Paul J. Pockros, M.D, Thomas A, Capozza M.D. 2005.Helminthic Infections of the Liver. *Infectious Disease Reports.* 7:61 –70p.

**“S”**

319. **Sahba, G., Arfaa, F., Farah Mandian, I., Jalali, H., 1972.** Animal fascioliasis in Khuzestan, southwestern Iran 58, 712–716.
320. **Salaun, K. (2004).** La fasciolose bovine en Mayenne: évaluation du risque d’infestation en troupeaux laitiers. Thèse méd. vét., Nantes, n° 113, 114 p.
321. **Salimi-Bejestani M. R., McGarry J. W., Felstead S., Ortiz P., Akca A., & Williams D. J. L. (2005).** Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Research in Veterinary Science*, 78, 177–181
322. **Samadi S, Roumegoux A, Bargues M.D, Mas-Coma S, Yong M, Pointier J.P.(2000).** Morphological studies of lymnaeid snails from the human fascioliasis endemic zone of Bolivia. *The Journal of Molluscan Studies* . 66: 31–44p. In : Hurtrez-Boussès S, Pendino A, Barnabé C, Durand P, Rondelaud D, Durand C, Meunier C, Hurtrez J.E and Renaud F. 2005. Comparison between shell morphology and genetic diversity in two sympatric lymnaeid snails, vectors of fasciolosis. *Canadian Journal of Zoology*. 83: 1643–1648p.
323. **Samuel AR, Knowles NJ, MacKay DKJ (1999)** Genetic analysis of type O viruses responsible for epidemics of foot-and-mouth disease in North Africa. *Epidemiol Infect* 122:529–538
324. **Santiago, N., Hillyer, G.V., 1988.** Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74, 810–818.
325. **Sargison, N. D., & Scott, P. R. (2011).** Diagnosis and economic consequences of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica* in a sheep flock in south-east Scotland. *Veterinary Record*, **168**, 159– 159.
326. **Sarkari B, Parhoode M, Abdolahi Khabisi S, Shafiei R, Mohammadi-Ghalehbin B (2017)** Genetic diversity of *Fasciola* spp. isolates from northern part of Iran: comparison with southwestern isolates. *J Parasit Dis* 41(3):768–772
327. **Savitskii, I.G. & Ponomareva, A.M. (1984).** Diagnosis of ovine dicrocoeliasis by the ELISA. *Veterinariya, Moscow, USSR*, 1: 43-44

328. **Schillhorn van Veen, T.W., Folaranmi, D.O., Usman, S., Ishaya, T., 1980.** Incidence of liver fluke infections (*Fasciola gigantica* and *Dicrocoelium hospes*) in ruminants in northern Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 12, 97–104.
329. **Schmidt, G.D., Roberts, L.S., 2005.** *Foundations of Parasitology* (7th ed.). McGraw-Hill Higher Education.
330. **Schröder, L. & Geyer, E. (1976).** Experimentelle *Dicrocoeliose*; Bildung humoraler Antikörper beim Goldhamster (*Mesocricetus auratus* WATERHOUSE). *Behring Inst. Mitt.*, 60: 24– 37
331. **Schuster, R., (1993).** Infection patterns in the first intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum*. *Vet. Parasitol.* 47, 235–243.
332. **Schweizer, G., Meli, M.L., Torgerson, P.R., Lutz, H., Deplazes, P., Braun, U., (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.
333. **Schweizer, G., Plebani, G.F., Braun, U., (2003).** Prävalenz von *Fasciola hepatica* und *Dicrocoelium dendriticum* beim Rind: Untersuchung in einem Ostschweizer Schlachthof. *Schweiz. Arch. Für Tierheilkd.* 145, 177–179.
334. **Sevo, S., (1971).** Note au sujet de l'identification de *Lymnaea truncatula* Muller, hete intermediaire de *Fasciola hepatica* Linn. *Parasitica* 27, 70–83.
335. **Sezgin, O., Altıntaş, E., Dişibeyaz, S., Saritaş, U., Sahin, B., (2004).** Hepatobiliary fascioliasis: clinical and radiologic features and endoscopic management. *J. Clin. Gastroenterol.* 38, 285–291.
336. **Shafiei R, Sarkari B, Sadjjadi SM, MowlaviGh R, Moshfe A (2014)** Molecular and Morphological Characterization of *Fasciola* spp. Isolated from different host species in a newly emerging focus of human fascioliasis in Iran. *Vet Med Int* 2014:1–10.
337. **Shahbazi, Y., Hashemnia, M., Safavi, E.A.A., (2016).** A retrospective survey of liver flukes in livestock based on abattoir data in Kermanshah, west of Iran. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 40, 948–953

338. **Simsek S, Utuk AE, Balkaya I (2011)** Molecular differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by PCR-RFLP and DNA sequence analysis. *Helmintologia* 48(1):3–7.
339. **Smith A.M, Dowd A.J, Heffernan M, Robertson C.D, Dalton J.P. (1993).** *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin Llike proteinase cleaves host immunoglobulin. *International Journal for Parasitology*. 23(8): 977–983p
340. **Soesetya, R. h. ., (1975).** The prevalence of *Fasciola gigantica* infection in cattle in East Java, Indonesia. *Malaysian Veterinary Journal*.v6
341. **Soulsby, E.J.L. (1982)** *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domestic Animals*. 7th Edition. Bailliere Tindal and Company London 800 – 809.
342. **Srairi MT, Benyoucef MT, Kraiem K (2013)** The dairy chains in North Africa (Algeria, Morocco and Tunisia): from self-sufficiency options to food dependency? *Springer Plus* 162(2):1–13
343. **Srihakim, S., Pholpark, M., (1991).** Problem of fascioliasis in animal husbandry in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 22 Suppl, 352–355.
344. **Stamatakis A (2006)** Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690.

**“T”**

345. **Tajima F (1989)** A Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595
346. **Tang, Z., Tang, Z., (1978).** Investigations on trematodes belonging to the family Dicrocoeliidae Odhner, 1911. *J. Xiamen Univ. Nat. Sci.* 17, 64–80.
347. **Tarry, D.W., 1969.** *Dicrocoelium dendriticum*: The Life Cycle in Britain. *J. Helminthol.* 43, 403–416.
348. **Tassin P.(2000).** Photographie n°295 dans "Manuel pratique : maladies des bovins", 3ème édition France agricole, Paris, page 138.
349. **Taylor, I.K., Taylor, M.M., 1965.** Another look at phonetic symbolism. *Psychol. Bull.* 64, 413–427.
350. **Thomas, A.P., (1883).** – The natural history of the liver fluke and the prevention of rot. *Royal Agricultural Society of England*, 19, 276-305.

351. **Thomas, I., Coles, G. C., & Duffus, K. (2000).** Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in southwest Wales. *Veterinary Record*, **146**, 200.
352. **Toet, H., Piedrafita, D. M., & Spithill, T. W. (2014).** Liver fluke vaccines in ruminants: Strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology*, **44**, 915–927.
353. **Torgerson, P., Claxton, J., (1999).** – Epidemiology and control. Chapter 4. In : Fasciolosis, by DALTON, J.P., ed. CABI Publishing, Oxon, UK, 113-149.
354. **Traore, A (1989).** Incidence de la fasciolose dans la région de Niono ,Mali central .Bulletin du C.I.P.E.A(Centre Internationale Pour l’Elevage en Afrique) .33 : 18 et 19.
355. **Turner, J., Howell, A., McCann, C., Caminade, C., Bowers, R. G., Williams, D., & Baylis, M. (2016).** A model to assess the efficacy of vaccines for control of liver fluke infection. *Scientific Reports*, **6**, 1–13.

“U”

356. **Urquhart G.M, Armour J.D, Duncan J.L, Dunn A.M., Jennings F.W. (1989).** *Veterinary Parasitology*. Low priced ed. English language book society Longman, Blackwell.286p.
357. **Usip. L.P.E, Ibanga. E.S, Edoho. H.J, Amadi. E.C, Utah. E. (2014).** Prevalence of Fascioliasis and the economic loss of condemned liver due to *Fasciola* infection in Cattle slaughtered at three abattoirs in Eket Urban, AkwaIbom State of Nigeria, *Glob. Adv. Res. J. Food Sci. Tech.* **3** 54e75.

“V”

358. **Valero MA, Bargues MD, Calderon L, Artigas P, Mas-Coma S (2018)** First phenotypic and genotypic description of *Fasciola hepatica* infecting highland cattle in the state of Mexico, *Mexico Infect. Genet Evol* **64**:231–240
359. **Valero, M.A., Bargues, M.D., Khoubbane, M., Artigas, P., Quesada, C., Berinde, L., Ubeira, F.M., Mezo, M., Hernandez, J.L., Agramunt, V.H., Mas-Coma,**

**S., (2016).** Higher physiopathogenicity by *Fasciola gigantica* than by the genetically close *F. hepatica*: experimental long-term follow-up of biochemical markers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 55–66.

360. **Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B.W.J., Hendriks, I.M., Gaasenbeek, C.P.H., Bokhout, B.A. (1998).** Protection to *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunology.* 20: 285-292.

361. **Vaughan, J.L, Charles, J.A, Boray, J.C.(1997).** *Fasciola hepatica* infection in farmed emus (*dromaius novaehollandiae*) *Australian Veterinary Journal.* 75, 811-813.

362. **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.

363. **Vissoh K.(1980).** Contribution à l'étude épizootiologique descriptive de la fasciolose bovine en Afrique de l'Ouest : cas du Nord de la République Populaire du Bénin.(Thèse de médecine vétérinaire). Ecole Inter-Eats des Sciences et Médecine Vétérinaires : Dakar, 180 p

#### “W”

364. **Wamae L.W., Ihiga M.K.(1991).** Fasciolosis as a limiting factor in livestock productivity. *Bull. Anim. Health. Prod. Afr.* 39 : 257-269.

365. **Wannasan A, Khositharattanakool P, Chaiwong P, Piangjai S, Uparanukraw P, Morakote N (2014)** Identification of *Fasciola* species based on mitochondrial and nuclear DNA reveals the coexistence of intermediate *Fasciola* sp. and *Fasciola gigantica* in Thailand. *Exp Parasitol* 146:64–70

366. **Wedrychowicz H., Ducommun D., Górski P., Pfister K.(1995).** Somatic antigens of adult *Dicrocoelium dendriticum* recognized by bile antibodies of naturally infected cattle *Vet. Parasitol,* 56, pp. 47-56

367. **Wicki P., Schwalbach B., Charbon J.L., Steiner A., Lang M., Loup F., et Pfister K. (1991).** Réactions cellulaires intestinales du bovin après infection par *Fasciola hepatica*. – *Schweiz. Arch. Tierheilk.* – 133,429-437.

368. **Wilson AC, Stoneking M, Cann RL, Prager EM, Ferris SD, Wrischnik LA, Higuchi RG. (1987).** Mitochondrial clans and the age of our common mother. In Human genetics (Vogel F, Sperling K, eds) pp. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
369. **Wilson, R.A., Denison, J., (1970).** Studies on the activity of the miracidium of the common liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 32, 301–313.
370. **Wolstenholme DR. (1992).** Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol.* 1992;141:173-216.
371. **World Health Organization, Savioli, L., Daumerie, D., World Health Organization (Eds.), 2013.** Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
372. **Wright P.S, Swire P.W. (1984).** Soil type and the distribution of *Lymnaea truncatula*. *The Veterinary Record.* 114 : 294-295p .In : Marie Rieu. Paramphistomoses gastroduodénales bovines : enquête épidémiologique en Champagne-Ardenne et mise au point d'un test E.L.I.S.A. pour la détection de coproantigènes parasitaires. L'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 2002, 251 p.

### “Y”

373. **Yap, H. Y., & Smooker, P. M. (2016).** Development of experimental vaccines against liver flukes. In H. Y. Yap (Ed.), *Vaccine design* (pp. 135– 151). New York: Springer.
374. **Yeneneh A , Kebede H , Fentahun T , Chanie M.(2012).** Prevalence of cattle flukes infection at Andassa Livestock Research Center in north-west of Ethiopia. *Veterinary Research Forum* ,spring; 3 (2): 85-9.

### “Z”

375. **Zagare Guy Martial Léandre (1992).** Etude épidémiologique de la fasciolose bovine au Burkina Faso ; 1992 Faculté de Médecine et de Pharmacie de DAKAR thèse de Docteur Vétérinaire. p :50

376. **Zait H. et Hamrioui B. (2005).** Nouveaux cas de fasciolose humaine en Algérie. *Médecine tropicale*.65, 4 : 395-396.

**References sites :**

- 1-<https://www.pinterest.com/pin/541417186434135423/>
- 2-<http://www2.estrellamountain.edu/faculty/farabee/BIOBK/fhepasec.jpg>
- 3-<https://www.fishersci.com/shop/products/prepared-individual-microscope-slides-fasciola-hepatica-distomum-hepaticum-beef-liver-fluke/s99456>
- 4-<http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/distomatoses/site/html/1.html>
- 5-[https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/64043](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/64043))
- 6-<http://www.pharma.unilim.fr/parasito/pages/geographie.html>)
- 7-[https://moodle.univ-tln.fr/pluginfile.php/147885/mod\\_resource/content/1/Tech-Immuno-2012.pdf](https://moodle.univ-tln.fr/pluginfile.php/147885/mod_resource/content/1/Tech-Immuno-2012.pdf)
- 8-[https://en.wikipedia.org/wiki/Formica\\_fusca](https://en.wikipedia.org/wiki/Formica_fusca))
- 9-[https://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A9ographie\\_de\\_1%27Alg%C3%A9rie#cite\\_note-5](https://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A9ographie_de_1%27Alg%C3%A9rie#cite_note-5)
- 10-<https://d-maps.com/index.php?lang=fr>
- 11-[https://fr.wikipedia.org/wiki/Daïras\\_de\\_la\\_wilaya\\_de\\_Tizi\\_Ouzou](https://fr.wikipedia.org/wiki/Daïras_de_la_wilaya_de_Tizi_Ouzou)
- 12-[https://fr.wikipedia.org/wiki/Daïras\\_de\\_la\\_wilaya\\_de\\_Béjaïa](https://fr.wikipedia.org/wiki/Daïras_de_la_wilaya_de_Béjaïa)
- 13-[https://fr.wikipedia.org/wiki/Daïras\\_de\\_la\\_wilaya\\_de\\_Bouira](https://fr.wikipedia.org/wiki/Daïras_de_la_wilaya_de_Bouira)
- 14-<https://d-maps.com/index.php?lang=fr>

## ANNEXES

**Annexe 1** : Articles publiés (Article 1, Article 2) et communications

**Annexe 2** : Fiche d'enquête

**Annexe 3** : protocole d'extraction d'ADN

**Annexe 4** : Evaluation de la qualité de l'ADN après amplification ( migration en gel d'Agarose 1%)

**Annexe 5** : séquences d'ADN (des différents haplotypes)

**Annexe 6** : Arbres de consensus construits avec la méthode NJ

**Annexe 7**: Variation des taux d'anticorps selon les différents facteurs de risques



## New insight into genetic variation and haplotype diversity of *Fasciola hepatica* from Algeria

Linda Chougar<sup>1</sup> · Nabil Amor<sup>2,3</sup> · Sarra Farjallah<sup>3</sup> · Khaled Harhoura<sup>1</sup> · Miriem Aissi<sup>1</sup> · Abdulaziz N. Alagaili<sup>2</sup> · Paolo Merella<sup>4</sup>Received: 24 November 2018 / Accepted: 14 February 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

### Abstract

The liver fluke *Fasciola hepatica* is the main cause of fasciolosis in North Africa leading to significant economic losses and public health problems. In this study, the ribosomal internal transcribed spacer (ITS), cytochrome c oxidase I (COI), the mitochondrial region spanning the COI-tmT-rnL, and the NADH dehydrogenase subunit I (NADI) markers were used to characterize *Fasciola* flukes from Algeria. *Fasciola* appeared widespread from the east to the west of Algeria. Among 1701 sampled cattle from 8 Algerian provinces, 5% were infected. Using morphological and morphometric analysis, one morphotype of *Fasciola* was observed. Nuclear ITS marker indicated that all collected flukes belong to *F. hepatica*. Multiple alignments of ITS dataset revealed two haplotypes, one described here for the first time. Analysis of molecular variance (AMOVA) of mitochondrial markers revealed weak population structure in Algeria. Mismatch distributions, neutrality tests, and median-joining network analysis all were compatible with a recent expansion of Algerian *F. hepatica* population. Fasciolosis appeared common in Algerian cattle, it seems that the absence of control strategy coupled to the favorable Mediterranean climate may lead to a reconstruction and dispersion of its populations. This study provides important results concerning the genetic characterization and variability of *F. hepatica* in Algeria as well as the significant role of cattle importation in shaping its dispersal route worldwide.

**Keywords** *Fasciola hepatica* · Algeria · Genetic characterization · ITS · NADI · COI · COI-tmT-rnL

Section Editor: Xing-Quan Zhu

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06270-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Nabil Amor  
namor@ksu.edu.sa; nabil.amor@gmail.com

<sup>1</sup> Animal Health and Productions Laboratory, High National Veterinary School-Algiers, B.P. 228, Oued Sumar, Algiers, Algeria

<sup>2</sup> KSU Mammals Research Chair, Department of Zoology, College of Science, King Saud University, P.O. Box 2455, Riyadh 11451, Saudi Arabia

<sup>3</sup> Research Unit of Integrative Biology and Evolutionary and Functional Ecology of Aquatic Systems, Faculty of Science of Tunis, University of Tunis El Manar, Tunis, Tunisia

<sup>4</sup> Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy

### Introduction

The liver flukes, *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 and *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856, are the cause of fasciolosis in humans and livestock (Mas-Coma and Bargues 1997). *Fasciola gigantica* has been reported in tropical areas, while *F. hepatica* is characterized by a worldwide distribution (Mas-Coma and Bargues 1997). Fasciolosis causes important economic losses (liver condemnation at slaughter, decreased milk production, mortality) (Nyindo and Lukumbagire 2015). The World Health Organization estimated that 2.4 million people are infected worldwide, with the highest prevalence in developing countries (Mehmood et al. 2017).

Traditional species identification is based on phenotypic characters of the adult worms, such as body width and length (Valero et al. 2018). However, several studies have revealed that morphological differences might be biased because of the presence of intermediate forms (Shafiei et al. 2014). Moreover, Dosay-Akbuluta et al. (2005) showed a greater intraspecific variation

between *Fasciola* spp. specimens from different hosts than the interspecific one.

Molecular classification has so far attested to be the method of choice, providing a clear differentiation between the two *Fasciola* spp. and the intermediated forms (hybrid and introgressed). Genetic characterization of *Fasciola* spp. can be carried out using several markers as the ribosomal internal transcribed spacer (ITS), phosphoenolpyruvate carboxykinase (pepck), DNA polymerase delta (pold), cytochrome c oxidase I (COI), and the NADH dehydrogenase (NAD) genes (Itagaki et al. 2005; Farjallah et al. 2009; Mas-Coma et al. 2009; Amor et al. 2011; Hayashi et al. 2016; Bargues et al. 2017; Carnevale et al. 2017; Ichikawa-Seki et al. 2017; Rouhani et al. 2017; Sarkari et al. 2017). In 2012, Le et al. proposed a duplex PCR based on the mitochondrial region COI-tmT-rmL as alternative to differentiate between species within overlapping geographic regions. Mitochondrial markers are also useful for studying population genetic structure. Hayashi et al. (2015, 2016) explored the dispersal routes of *F. gigantica* in Southeast Asia using mitochondrial NAD1 dataset and revealed the significant role of the host movement in shaping its genetic structure.

*F. hepatica* is widely distributed in North Africa (Mekroud et al. 2004; Farjallah et al. 2009; Amor et al. 2011; Ouchene-Khelifi et al. 2018). Egypt is still the only North African country where both *Fasciola* spp. and their aspermic hybrids have been described (Amer et al. 2016).

In Algeria, fasciolosis is very common, especially within the humid northern region favorable for the survival of the intermediate host, the snail *Galba truncatula* Müller, 1774 (Mekroud et al. 2004; Righi et al. 2016). The prevalence of fasciolosis has been reported to vary from 6.5 to 18.2% in sheep and from 9.1 to 27% in cattle (Mekroud et al. 2004; Ouchene-Khelifi et al. 2018). Ouchene-Khelifi et al. (2018) reported the condemnation of over 3000 infected liver in El Tarf region, which correspond to an economic loss of 60,000 euros.

Despite the impact of fasciolosis in Algeria, only one study restricted to a single locality has assessed the genetic diversity of *Fasciola* flukes collected from sheep (Farjallah et al. 2009). Therefore, the objective of the present study is to investigate the genetic variability of *Fasciola* samples, recovered from different Algerian provinces, based on several molecular markers (ITS, COI-tmT-rmL, NAD1, and COI). It is the first time that a study will include several regions from the eastern to the western part of Algeria. In addition, data dealing with the prevalence and the morphometric variability of *Fasciola* samples in the studied localities will be provided.

## Materials and methods

### Study area

The study was carried out in eight provinces of northern Algeria: Bejaïa, Souk-Ahras, Batna, Médéa, Tissemsilt,

Tiaret, Tlemcen, and Ain-Temouchent (Fig. 1; Table 1). Samples from Bejaïa province were collected from 12 different districts (Fig. 1; Table 1). The studied area is characterized by a Mediterranean climate, and it is divided by two geographic barriers, the Tell and the Sahara Atlas. North Algeria is characterized by a cold winter and warm summer with significant rainfall. These conditions are advantageous for the transmission of *Fasciola*.

### *Fasciola* samples and morphometric analysis

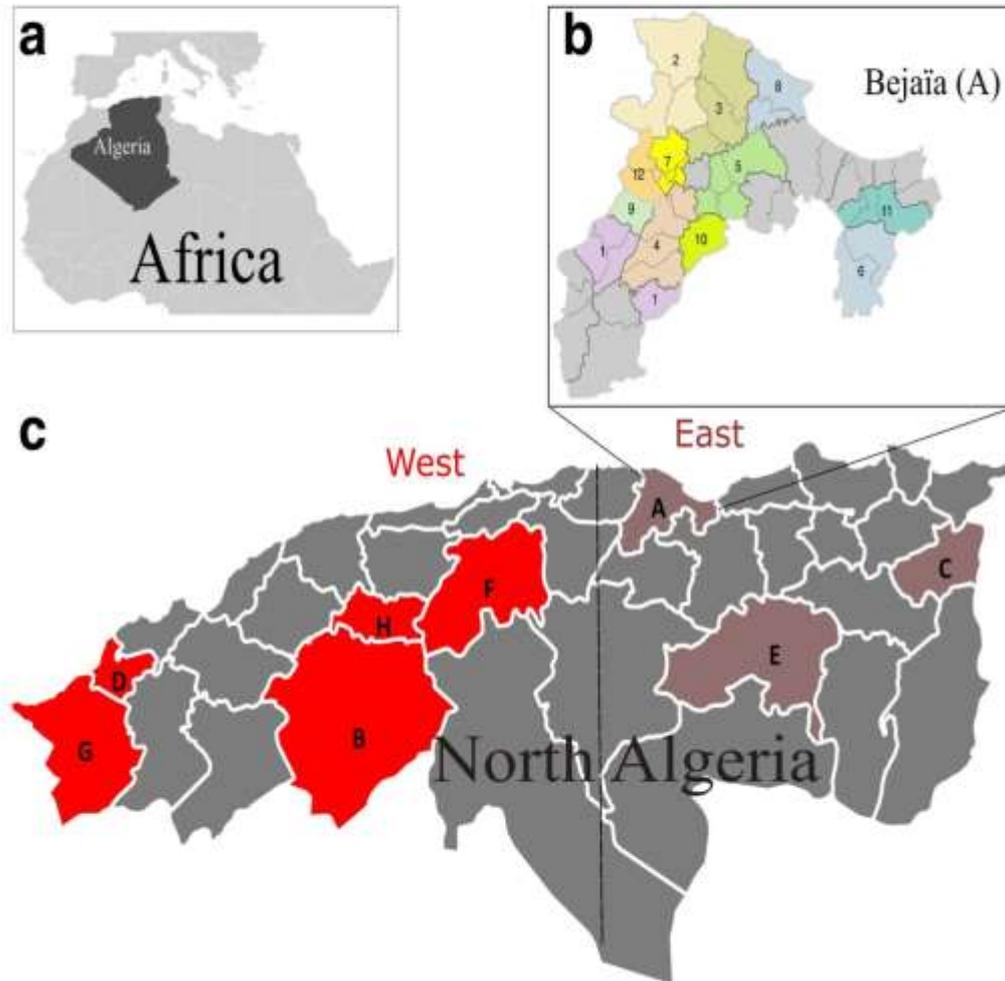
After post-mortem examination of 1701 cattle by veterinary officers, adult flukes were collected from 87 infected livers from January to December 2017 (Table 1). Samples were collected in plastic jars and then washed in PBS.

The body length (BL) and body width (BW) were measured using digital calipers prior to photography (Ashrafi et al. 2006). Body length to width ratio (BL/BW) was also calculated for each specimen. One-way analysis of variance (ANOVA), implemented in SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL), was conducted in order to determine whether there was any significant morphometric variation between flukes isolated from different localities.

Localities were divided into two groups, eastern, including Bejaïa, Souk-Ahras, and Batna, and western, including Médéa, Tissemsilt, Tiaret, Tlemcen, and Ain-Temouchent.

### DNA extraction, amplification, and sequencing

One to three adult flukes were selected randomly from each host for molecular analysis, for a total of 140 specimens. Samples were stored in 70% ethanol and preserved at -20 °C. Genomic DNA was extracted from a portion of the lateral zone of the adult fluke using Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, USA) according to the manufacturer's recommendations. For amplification, 1 µL of genomic DNA was added in a 25 µL reaction mix containing, 1 U of MyTaq DNA polymerase (Bioline, Memphis, USA), 5 µL 5× MyTaq buffer, 10 pmol of each primer, and ddH<sub>2</sub>O. The primers BD1 and BD2 were used for the amplification of ITS region including ITS-1, 5.8S rDNA and ITS-2, FhF and FHR for COI-tmT-rmL (Le et al. 2012), Ita 10 and Ita 2 for NAD1 (Itagaki et al. 2005), and JB3 and JB4 for COI (Bowles et al. 1992). Reaction cycles consisted of an initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 90 s, 55 °C (for COI) or 53 °C (for NAD1), 52 °C (COI-tmT-rmL) or 62 °C (for ITS) for 90 s, and 72 °C for 120 s with a final extension at 72 °C for 10 min. During amplifications, negative control was included to assess possible contamination. All the PCR products were sequenced using forward primers at Macrogen sequencing facility (Macrogen Inc., Seoul, Korea).



**Fig. 1** Map of Algeria (a), Bejaïa (b), North Algeria (c). Provinces: Bejaïa (A), Tiaret (B), Souk-Ahras (C), Ain-Temouchent (D), Batna (E), Médéa (F), Tlemcen (G), and Tissemsilt (H). Districts: Akbou (1)

Adekar (2), El Kseur (3), Seddouk (4), Amizour (5), Kherrata (6), Sidi-Aïch (7), Béjaïa (8), Ouzellaguen (9), Beni Maouche (10), Darguina (11), and Chemini (12)

### Data analysis

Seaview 3.2 (Galtier et al. 1996) was used to perform multiple alignments for each genetic marker. The sequences of the two mitochondrial genes were translated into amino acids to check for possible amplification of pseudogenes. Representative sequences of *F. hepatica*, *F. gigantica*, and the aspermic *Fasciola* available in GenBank were included in the three datasets (ITS, COI, and NADI) (Table 2).

Haplotype (Hd) and nucleotide ( $\pi$ ) diversities were estimated and the mismatch distribution for the two mitochondrial markers was constructed using DnaSP v 5.10 (Librado and Rozas 2009).

Tajima's D (Tajima 1989) and Fu's Fs (Fu 1997) were performed to evaluate the assumption of selective neutrality

of mtDNA sequences and population mutation-drift equilibrium.

In addition, the genetic structure of *F. hepatica* in Algeria was estimated via a spatial analysis of molecular variance (AMOVA) implemented in Arlequin 3.5 (Excoffier et al. 2005). The studied populations were grouped according to their origin, eastern and western populations. Levels of significance of statistics characterizing variation at different hierarchical levels were assessed through 10,000 permutations.

The evolutionary relationships between mitochondrial haplotypes were analyzed for both markers NADI and COI, by a median-joining network (Bandelt et al. 1999) constructed with Network 5.0 (Fluxus Technology Ltd.).

The best-fitting models of molecular evolution applied to the datasets in the phylogenetic reconstructions were inferred

**Table 1** Number of cattle slaughtered and prevalence of livers infected with fascioliasis from Algeria. Codes used for each province or district are given in parentheses

Province	District	N. examined	N. infected	Prevalence (%)
Bejaïa (A)	Akbou (1)	95	10	10.5
	Adekar (2)	77	8	10.4
	El Kseur (3)	81	4	4.9
	Seddouk (4)	65	4	6.2
	Amizour (5)	96	6	6.3
	Kherrata (6)	61	7	11.5
	Sidi-Aïch (7)	106	5	4.7
	Bejaïa (8)	83	2	2.4
	Ouzellaguen (9)	87	4	4.6
	Beni Maouche (10)	80	3	3.8
	Danguina (11)	73	5	6.8
	Chemini (12)	187	6	3.2
Tiaret (B)		122	3	2.45
Souk-Ahras (C)		18	4	22.3
Ain-Temouchent (D)		113	5	4.4
Batna (E)		30	2	6.7
Médéa (F)		88	3	3.4
Tlemcen (G)		111	3	2.7
Tissemsilt (H)		128	3	2.3
Total		1701	87	5.1

with jModeltest 2.1.8 (Darriba et al. 2012), based on the Akaike information criterion (Akaike 1974).

Neighbor joining (NJ) and maximum likelihood (ML) analyses were carried out to infer the relationships among NADI and COI haplotypes using Seaview 3.2 and RAxML (Stamatakis 2006), respectively. *Fascioloides magna* (EF535001, EF534997) was included as outgroup. In both tree constructions, bootstrap support was evaluated by 1000 pseudoreplicates. A consensus topology was generated using 50% of the resulting trees.

## Results

The overall prevalence of fasciolosis in cattle from northern Algeria was 5.1% ( $n = 87$ ). Comparing provinces, prevalence varied from 2.3% (Tissemsilt) to 22.0% (Souk-Ahras) (Table 1). Concerning Bejaïa province, the overall prevalence was 5.8% and between districts, it varied from 3.2% (Chemini) to 11.5% (Kherrata). All flukes were leaf shaped presenting oblique body angle with apparent shoulders, morphological characters specific to *F. hepatica*. One-way ANOVA showed no significant difference between eastern and western samples for all parameters (body width, body

length, and ratio body length body width ratio) (Supplementary materials Table 1).

## Molecular analysis

ITS fragments sequencing yielded sequence of a length of about 959 bp. Annotation of ITS was inferred by multiple alignments with *Fasciola* spp. sequences available in GenBank. This genetic marker includes a partial 18S fragment of 41 bp, whole ITS-1, and 5.8S sequences, 435 bp and 137 bp respectively, and whole ITS-2 sequence of 346 bp (Table 2).

Sequences of multiple alignment confirmed the conservation of the 18S and 5.8S rDNA within *Fasciola* sp. ITS-1 sequences were 100% identical to those of *F. hepatica* previously published (Itagaki et al. 2005; Mekroud et al. 2004; Farjallah et al. 2009; Amor et al. 2011; Ouchene-Khelifi et al. 2018). *F. hepatica* differed from *F. gigantica* in five substitutions (Table 2). Alignment of ITS-2 sequences showed ten variable sites within *Fasciola*. Comparing *F. hepatica* sequences, two different substitutions generating 3 haplotypes were observed (Table 2). The first substitution, transition, at the position 892 (C/T) differentiates between the common haplotype, FhITS2-H1, described worldwide and the second one, FhITS2-H2 (accession number = MK212149), previously reported in Spain, Algeria, and recently in South America (Alasaad et al. 2007; Farjallah et al. 2009; Valero et al. 2018). The second substitution was a transversion located at the position 935 (T/A), indicating the existence of a new haplotype, FhITS2-H3 (accession number = MK212150), reported here for the first time. Among the 140 Algerian *F. hepatica*, 95 samples belonged to the common haplotype FhITS2-H1, having a "T" at the position 935, and 35 belong to the new haplotype FhITS2-H3, having an "A" at this position. Within the eastern localities, both haplotypes (45% FhITS2-H1, 55% FhITS2-H3) were observed. However, FhITS2-H1 appeared more abundant in western Algeria (86%). Haplotype diversity (H) varied from 0.503 in the eastern to 0.239 in the western.

According to AMOVA outputs, most variations within populations explained the observed variation for COI (95%), COI-trnT-rnL (81%), and NADI (86%). AMOVA revealed that 11.39%, 14.31%, and 12.76% of the total variation of COI, COI-trnT-rnL, and NADI, respectively, was among groups (Table 3).

Amplification of COI-trnT-rnL yielded products of 1031 bp specific to *F. hepatica* (Le et al. 2012). Alignment of the nucleotide sequences generated eight haplotypes (accession numbers = MK372236–43) differing in eight sites. Nucleotide diversity was low for COI-trnT-rnL ( $\pi = 0.0017$ ); however, haplotype diversity was high ( $Hd = 0.802$ ). Median-joining network analysis showed a star-like pattern. The common haplotype FhCOI-trnT-rnL-H1 (accession number = MK372236) occupied a basal position in the network (Fig. 2a) and was shared by all localities ( $n = 37$ ,

**Table 2** Details of *Fasciola* ITS sequences from Algeria and other countries

		ITS1					ITS2											
		50	140	234	312	332	823	847	874	886	892	935	943	950	957	958		
<i>F. gigantica</i>	Niger	T	T	T	A	T	C	C	T	T	C	T	-	A	A	T	AM900371	Ali et al. (2008)
	Egypt	T	T	T	A	T	C	C	T	T	C	T	-	A	T	A	EF612472-84	Lotfy et al. (2008)
	China	T	T	T	A	T	C	C	T	T	C	T	-	-	T	A	KF543340	Liu et al. (2014)
<i>F. hepatica</i>	Niger	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	AM900370	Ali et al. (2008)
	Egypt	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	EF612468	Lotfy et al. (2008)
	Spain	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	AM709498	Alasand et al. (2007)
	Spain	C	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	T	G	T	A	AM709621	Alasand et al. (2007)
	Bolivia	C	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	T	G	T	A	MG569981	Valero et al. (2018)
	Spain	C	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	T	G	T	A	MG569978	Valero et al. (2018)
	Bolivia	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	MG569977	Valero et al. (2018)
	Mexico	C	A	C	T	C	T	T	C	C	T	T	T	G	T	A	MG569976	Valero et al. (2018)
	Tunisia	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C/T	T	T	G	T	A	GQ231546	Farjallah et al. (2009)
	Algeria	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C/T	T	T	G	T	A	GQ231547	Farjallah et al. (2009)
	China	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	T	A	KX856340	Ai et al. (2017)
	Algeria	C	A	C	T	C	T	T	C	C	C	A/T	T	G	T	A	MK212149-50	Present study

39%). Haplotype FhCOI-tmT-rrL-H3 (accession number = MK372238) was specific to Bejaia. The remaining haplotypes differ in a single mutation step and were detected in more than three localities (Table 4; Fig. 2a).

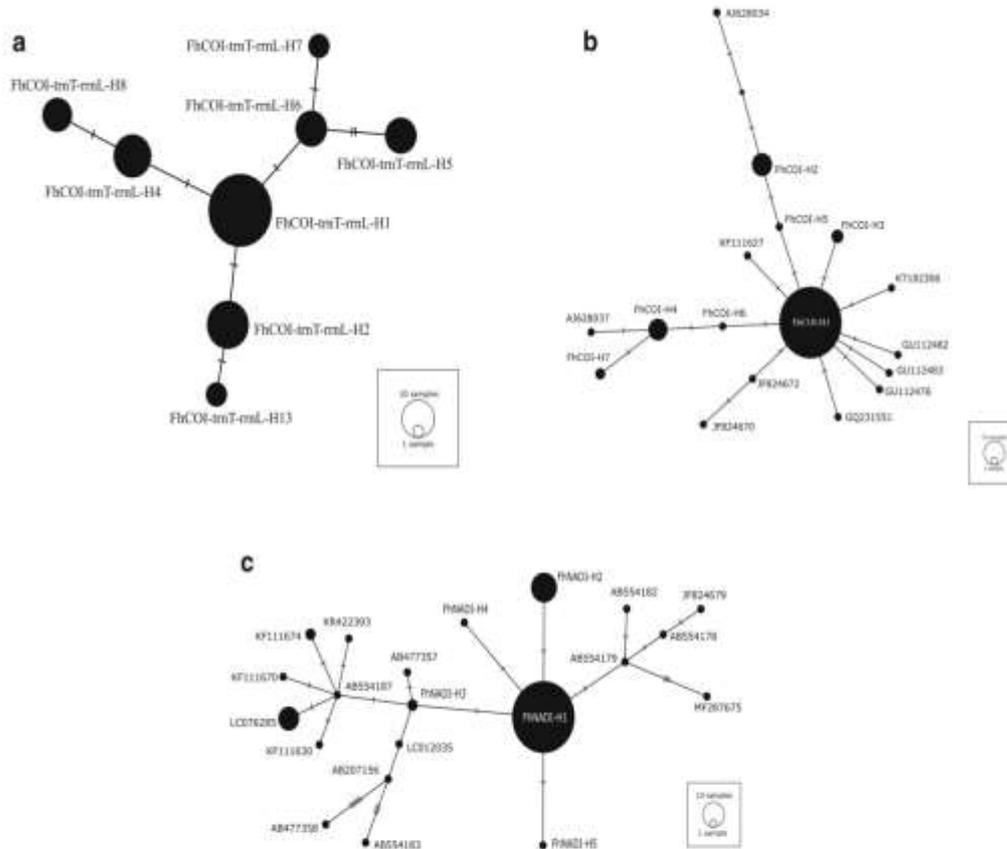
Analysis of partial COI sequences (391 bp) yielded seven haplotypes (FhCOI-H1–FhCOI-H7, accession numbers = MK212142–48) differing in six sites (Table 5). COI dataset showed low nucleotide ( $\pi = 0.0024$ ) and haplotype diversity ( $Hd = 0.428$ ). Median-joining network analysis generated a

star-like pattern (Fig. 2b). The majority of Algerian *F. hepatica* appeared carrying the haplotype FhCOI-H1 occupying a basal position in the network. The largest proportion (70%) of flukes belonging to this predominant haplotype was from Bejaia. The remaining haplotypes appeared diverging from FhCOI-H1 at least in one nucleotide. Haplotypes FhCOI-H2 to FhCOI-H6 were observed only in Bejaia and FhCOI-H5 and FhCOI-H6 were unique. Haplotype FhCOI-H7 was detected in two localities, Tiaret and Ain-Temouchent,

**Table 3** Analysis of molecular variance (AMOVA)

	Source of variation	Sum of squares	Variance components	% variation	<i>P</i> value
COI-tmT-rrL	Among groups	7.706	0.03725 Va	4.495	0.030
	Among populations within groups	4.287	0.01155 Vb	1.394	0.013
	Within populations	163.776	0.77989 Vc	94.111	0.000
	Total	175.770	0.82868		
NADI	Among groups	0.933	0.01881 Va	12.76	0.17595
	Among populations within groups	0.829	0.00155 Vb	1.05	0.0567
	Within populations	11.186	0.12712 Vc	86.19	0.000
	Total	12.948	0.14748		
COI	Among groups	1.406	0.03649 Va	11.39	0.04106
	Among populations within groups	0.903	-0.02068 Vb	-6.46	0.0315
	Within populations	26.491	0.30449 Vc	95.07	0.000
	Total	28.800	0.32030		

Percentage of variation explained by different hierarchical levels for COI and NADI loci considering two groupings in *F. hepatica*



**Fig. 2** Haplotype network obtained from COI-trnT-rnL (a), COI (b), and NADI (c) sequences. The area of each circle is proportional to the haplotype frequency, and each branch represents one mutation

in western Algeria. After adding representative sequences of *F. hepatica* from different countries to COI dataset, the

network pattern was the same (Fig. 2b). This confirms the close relationships among *F. hepatica* haplotypes.

**Table 4** Details of *Fasciola* COI-trnT-rnL sequences from Algeria and other countries

Marker	Location	Accession number	Reference	Haplotype
COI	Algeria (all localities)	MK372236	Present study	FbCOI-trnT-rnL-H1
	Algeria (all localities)	MK372237	Present study	FbCOI-trnT-rnL-H2
	Algeria (A)	MK372238	Present study	FbCOI-trnT-rnL-H3
	Algeria (all localities)	MK372239	Present study	FbCOI-trnT-rnL-H4
	Algeria (all localities)	MK372240	Present study	FbCOI-trnT-rnL-H5
	Algeria (all localities)	MK372241	Present study	FbCOI-trnT-rnL-H6
	Algeria (all localities)	MK372242	Present study	FbCOI-trnT-rnL-H7
	Algeria (all localities)	MK372243	Present study	FbCOI-trnT-rnL-H8
Egypt	KU058263	Arafa et al. (2018)		
Egypt	KU058264	Arafa et al. (2018)		
Japan	AP017707	Coghlan et al. (2019)		
Australia	AF216697	Le et al. (2000)		

Provinces: Bejaïa (A), Tiaret (B), Souk-Ahras (C), Ain-Temouchent (D), Batna (E), Médéa (F), Tlemcen (G), and Tissemsilt (H)

**Table 5** Details of *Fasciola* COI sequences from Algeria and other countries

Marker	Location	Accession number	Reference	Haplotype
COI	Algeria (all localities)	MK212142	Present study	FbCOI-H1
	Algeria (Mostaganem northwest of Algeria)	GQ231549	Farjallah et al. (2009)	FhCOI-H1
	Tunisia	GQ231548	Farjallah et al. (2009)	FhCOI-H1
	Egypt	KX470584	Lotfy et al. (2008)	FhCOI-H1
	Egypt	AB510491	Omar et al. (2013)	FhCOI-H1
	South Africa	KT182300, 04, 05	Mucheka et al. (2015)	FhCOI-H1
	France	AJ628039	Dong et al. (unpublished)	FhCOI-H1
	Turkey	GQ121276	Simsek	FhCOI-H1
	Spain	KF111618	Martinez-Valladares and Rojo-Vázquez (2014)	FbCOI-H1
	Algeria Bejaia	MK212143	Present study	FhCOI-H2
	Algeria Bejaia	MK212144	Present study	FhCOI-H3
	Algeria Bejaia	MK212145	Present study	FhCOI-H4
	South Africa	KT182260	Mucheka et al. (2015)	FhCOI-H4
	Tunisia	GQ231550	Farjallah et al. (2009)	FhCOI-H4
	Australia	AF216697	Let et al. 2000	FhCOI-H4
	China	AJ628035, 38	Dong et al. (unpublished)	FhCOI-H4
	Algeria Bejaia	MK212146	Present study	FhCOI-H5
	Algeria Bejaia	MK212147	Present study	FhCOI-H6
	Algeria Tiarret–Ain-Temouchent	MK212148	Present study	FhCOI-H7
	Tunisia	GQ231551	Farjallah et al. (2009)	
	Zimbabwe	KT182306	Mucheka et al. (2015)	
	France	GU112476	Ai et al. (2011)	
	Italy	JF824670, 72	Farjallah et al. (2013)	
	Spain	KF111627	Martinez-Valladares and Rojo-Vázquez (2014)	
	Japan	AP017707	Coghlan et al. (2019)	
	china	AJ628034	Dong et al. (unpublished)	
	USA	GU112482-3	Ai et al. (2011)	

The 140 partial NADI sequences (525 bp) included four variable sites and generated five haplotypes (FhNADI-H1–FhNADI-H5 (accession numbers = MK212137–41)) (Table 6; Fig. 2c). FhNADI-H1 was the most common haplotype (80%) and included samples from all localities, 77% from Bejaia. FhNADI-H2 included exclusively samples from Bejaia; FhNADI-H3 was observed only in Tlemcen and Souk-Ahras; and FhNADI-H4 and FhNADI-H5 were unique to Ain-Temouchent and Batna, respectively. Nucleotide and haplotype diversities were very low ( $\pi = 0.0006$ ,  $H_d = 0.313$ ).

Reference haplotypes from Egypt, Uruguay, Iran, and Spain were closely related to FhNADI-H1 while sequences from Egypt, Italy, France, Iran, Japan, Australia, and China were similar to FhNADI-H2. Two additional haplogroups showed independent segregation, one mutation, from FhNADI-H1. The first haplogroup included spermic flukes from Egypt, Italy, and Brazil. The second included more divergent *F. hepatica* from Spain, Poland, Ireland, Japan, China, and Peru (Table 6; Fig. 2c).

Neutrality tests Tajima's D and Fu's FS showed significant negative values (Supplementary materials Table 2), indicating an excess of rare polymorphisms in the studied population. Mismatch distributions for both mitochondrial markers were L-shaped unimodal and supported the assumption of a sudden expansion model (Fig. 3a–c).

The optimum evolutionary models selected by jModelTest were GTR + I, HKY, and GTR for COI, NADI, and COI-trnT-rnL genes, respectively. Both phylogenetic analyses showed similar topologies for COI, NADI, and COI-trnT-rnL. Only the ML trees are shown (Fig. 4a–c). Node support values within the text consist of ML bootstrap values. Two well-supported sister groups corresponding to *F. hepatica* and *F. gigantica* were observed. Algerian flukes belonged to a monophyletic group including all *F. hepatica*. In NJ (Supplementary materials Figure 1a–c) and ML trees, bootstrap values for this clade were higher than 80% for COI and 99% for COI-trnT-rnL and NADI. Within *F. hepatica* clade, all nodes were weakly supported.

**Table 6** Details of *Fasciola* NAD1 sequences from Algeria and other countries

Marker	Location	Accession number	Reference	Haplotype
NAD1	Algeria Bejaïa	MK212137	Present study	FhNADI-H1
	Italy	JF824675	Farjallah et al. (2013)	FhNADI-H1
	France	KJ200623	Wannasan et al. (2014)	FhNADI-H1
	Egypt	AB554177	Amer et al. (2011)	FhNADI-H1
	Egypt	LC076285	Amer et al. (2016)	FhNADI-H1
	Iran	GQ175362	Mouazeni et al. (2012)	FhNADI-H1
	Japan	LC228620	Ohari et al. (2017)	FhNADI-H1
	China	AB477363	Peng et al. (2009)	FhNADI-H1
	Australia	AF216697	Le et al. (2000)	FhNADI-H1
	Australia	AB207155	Itagaki et al. (2005)	FhNADI-H1
	Algeria all localities	MK212138	Present study	FhNADI-H2
	Egypt	AB554187, 92	Amer et al. (2011)	FhNADI-H2
	China	AB477357	Peng et al. (2009)	FhNADI-H2
	Uruguay	AB207154	Itagaki et al. (2005)	FhNADI-H2
	Iran	GQ356033	Mouazeni et al. (2012)	FhNADI-H2
	Algeria Tlemcen, Ain-Temouchent	MK212139	Present study	FhNADI-H3
	Algeria Ain-Temouchent	MK212140	Present study	FhNADI-H4
	Algeria Batna	MK212141	Present study	FhNADI-H5
	Egypt	LC076240, 85	Amer et al. (2016)	
	Egypt	AB554178, 79, 82, 83, 87	Amer et al. (2011)	
	Italy	JF8246779	Farjallah et al. (2013)	
	Ireland	AB207156	Itagaki et al. (2005)	
	Poland	KR422393	Januszkiewicz et al. (2015)	
	Brazil	MF287675	Labruna et al. 2018	
	Japan	LC012035	Ichikawa-Seki et al. (2017)	
	China	AB477357, 58	Peng et al. (2009)	
	Spain	KF111630, 64, 67, 7474	Martinez-Valladares and Rojo-Vázquez (2014)	
	Peru	LC070669	Ichikawa-Seki et al. (2016)	

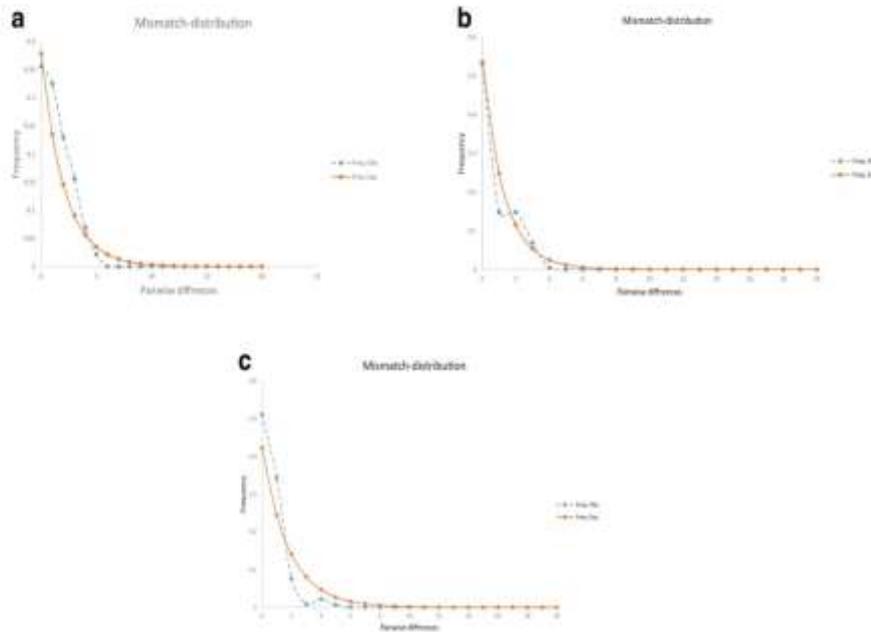
## Discussion

Fasciolosis is a water-borne parasitic zoonosis causing significant economic losses worldwide (Nyindo and Lukumbagire 2015). The control of such infections requires epidemiological studies and a prior genetic characterization.

Previous studies have reported that fasciolosis is very common in Algeria (Mekroud et al. 2004; Righi et al. 2016). The overall prevalence observed here in cattle was lower than previous published values in Jilil area (27.0%) (Mekroud et al. 2004) and El Tarf (26.7%) (Ouchene-Khelifi et al. 2018). Only in Souk-Ahras, prevalence was high and reached 22.3%. Ouchene-Khelifi et al. (2018) reported a similar value from El Tarf region. Among the remaining provinces and districts, values ranged between 2.3 and 11.5%. This apparent reduction of prevalence could be associated to several causes, as a change of the biotope, the application of control plans, or a significant drop in host number (Mas-Coma et al. 2008). Further, the use of anthelmintics can explain the observed low prevalence.

Present results are comparable to previous epidemiologic studies from different countries. The overall prevalence was 9.77% in Egypt (ElTahawy et al. 2017) and 12.6% in Tunisia (Hamed et al. 2014). In France, Meissonnier and Mage (2007) reported a fluctuation of the prevalence between 3.7 to 10.8%.

In the present work, both morphometric and molecular analysis of *Fasciola* flukes, collected from eight Algerian provinces, revealed the existence of the single species *F. hepatica*. Actually, using morphometric analysis, one single morphotype was observed. Several studies considered that the ratio body length/body is an appropriate character differentiating *F. hepatica* from *F. gigantica* (Ashrafi et al. 2006; El-Rahimy et al. 2012; Asadian et al. 2013; Aryaeipour et al. 2017). Farjallah et al. (2009) were the first to use molecular markers to characterize Algerian (Mostaganem Province) flukes from sheep. Here, a single ITS-1 haplotype was observed within the eight studied province. The nuclear sequence ITS-1 is a consistent phylogenetic marker allowing the characterization of *Fasciola* species (Itagaki et al. 2005;



**Fig. 3** Mismatch distribution to test the expansion of *F. hepatica* isolates. The number of nucleotide differences between pairs of sequences is indicated along the X-axis, and their frequency along the Y-axis. COI-trnT-rnL (a), COI (b), and NADI (c)

Farjallah et al. 2009; Rokni et al. 2010; Amor et al. 2011). Among the studied samples, the haplotype FhITS2-H2 was not observed. It was previously reported in Spain (Alasaad et al. 2007), Algeria (Farjallah et al. 2009), and recently in South America (Valero et al. 2018). However, the new FhITS2-H3 haplotype is described for the first time, as the result of a polymorphism at the position 935 (T/A). This haplotype probably spread throughout Algeria because of movements of infected animals between provinces via nomadism or transhumance systems (Gabli et al. 2015).

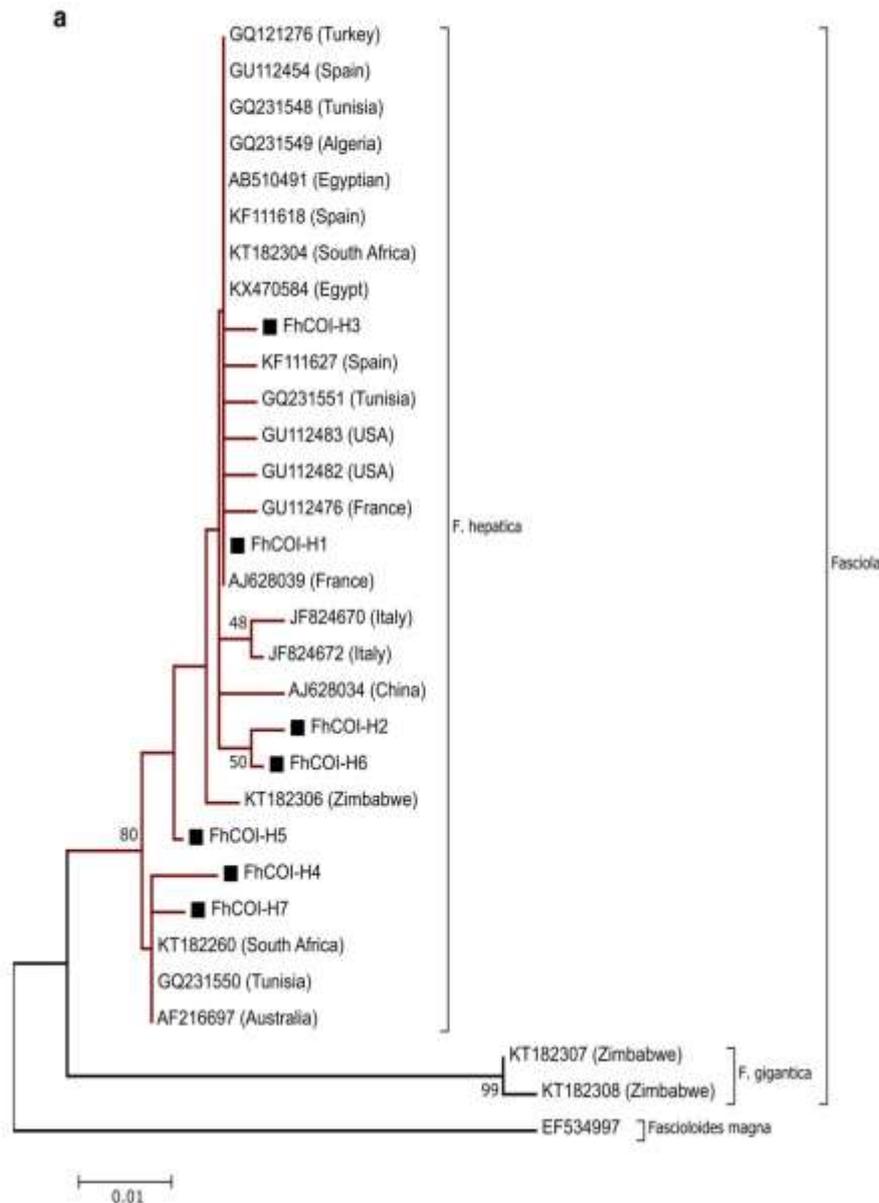
Mitochondrial marker results were consistent with previous finding (Itagaki et al. 2005; Farjallah et al. 2009; Amor et al. 2011; Carnevale et al. 2017; Rouhani et al. 2017; Sarkari et al. 2017; Valero et al. 2018) insofar as all Algerian haplotypes belonged to a monophyletic clade—*F. hepatica*. Both COI and NADI datasets showed low nucleotide and haplotype diversity, with seven and five haplotypes for COI and NADI, respectively. However, COI-trnT-rnL showed low nucleotide diversity and high haplotype diversity. This pattern usually indicates a recent bottleneck followed by rapid population growth (Grant and Bowen 1998).

Median-joining network analysis generated star-like patterns. Common haplotypes (FhCOI-trnT-rnL-H1, FhCOI-H1, and FhNADI-H1), with basal position within both networks, are probably the source of dispersion of *F. hepatica* through the country, especially within the humid northern region. Moreover, COI and NADI haplotypes appear shared

with several countries (Tunisia, Egypt, South Africa, Turkey, France, Italy, and Spain), suggesting that they may have a common origin (Le et al. 2000; Itagaki et al. 2005; Lotfy et al. 2008; Farjallah et al. 2009, 2013; Amor et al. 2011; Simsek et al. 2011; Omar et al. 2013; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez 2014; Wannasan et al. 2014; Mucheka et al. 2015; Valero et al. 2018). Remaining references from Tunisia, France, Italy, Spain, China, Japan, and USA were derived from common haplotypes with one to three nucleotide substitutions. These results suggest that imported cattle might have a significant impact to the entry of *F. hepatica* into Algeria. Srairi et al. (2013) stated that Algerian authorities have ensured the annual supply of imported cattle as a response to the demographic expansion. The majority of cattle are imported from France and Spain, with 40,000/year each.

NJ and ML showed low bootstrap values within the clade of *F. hepatica*, confirming the close relationship between *F. hepatica* haplotypes from different origins.

AMOVA revealed a weak population structure in Algeria. In addition, L-shaped unimodal mismatch distributions for COI, NADI, and COI-trnT-rnL were observed and star-like patterns for median-joining network analysis, both compatible with population expansions. Negative values of neutrality tests point to the same results. During the last decades, several reports indicated the foot-and-mouth disease (FMD) as the key factor affecting several



**Fig. 4** Consensus trees constructed with ML method showing phylogenetic relationships among *F. hepatica* and *F. gigantica*. Phylogenies inferred from COI (a), NADI (b), and COI-trnT-rnL (c)

sequences. Numbers shown at nodes of branches are bootstrap values. *Fascioloides magna* (COI, NADI, and COI-trnT-rnL) was used as outgroup

species farms (bovine, sheep, and goat) in Algeria (Samuel et al. 1999, Kardjadj 2018). In fact, after 2014, an outbreak of FMD destroyed 30% of Algerian cattle. The drop in host species population size is clearly a source of the observed decrease of genetic variability of the parasite. The observed population expansions as well as the reported prevalence could be correlated to the absence of a control strategy in Algeria.

Genetic diversity and expansion of *F. hepatica* population could also be influenced by the intermediate host, *Galba truncatula*, where clonal expansion of *Fasciola* occurs (Beesley et al. 2017). Vilas et al. (2012) confirmed the potential of the intermediate host to disseminate metacercariae with identical genotype in pasture. They also found the same multilocus genotype of *Fasciola* shared between definitive hosts (cattle and sheep). When studying cattle and sheep,

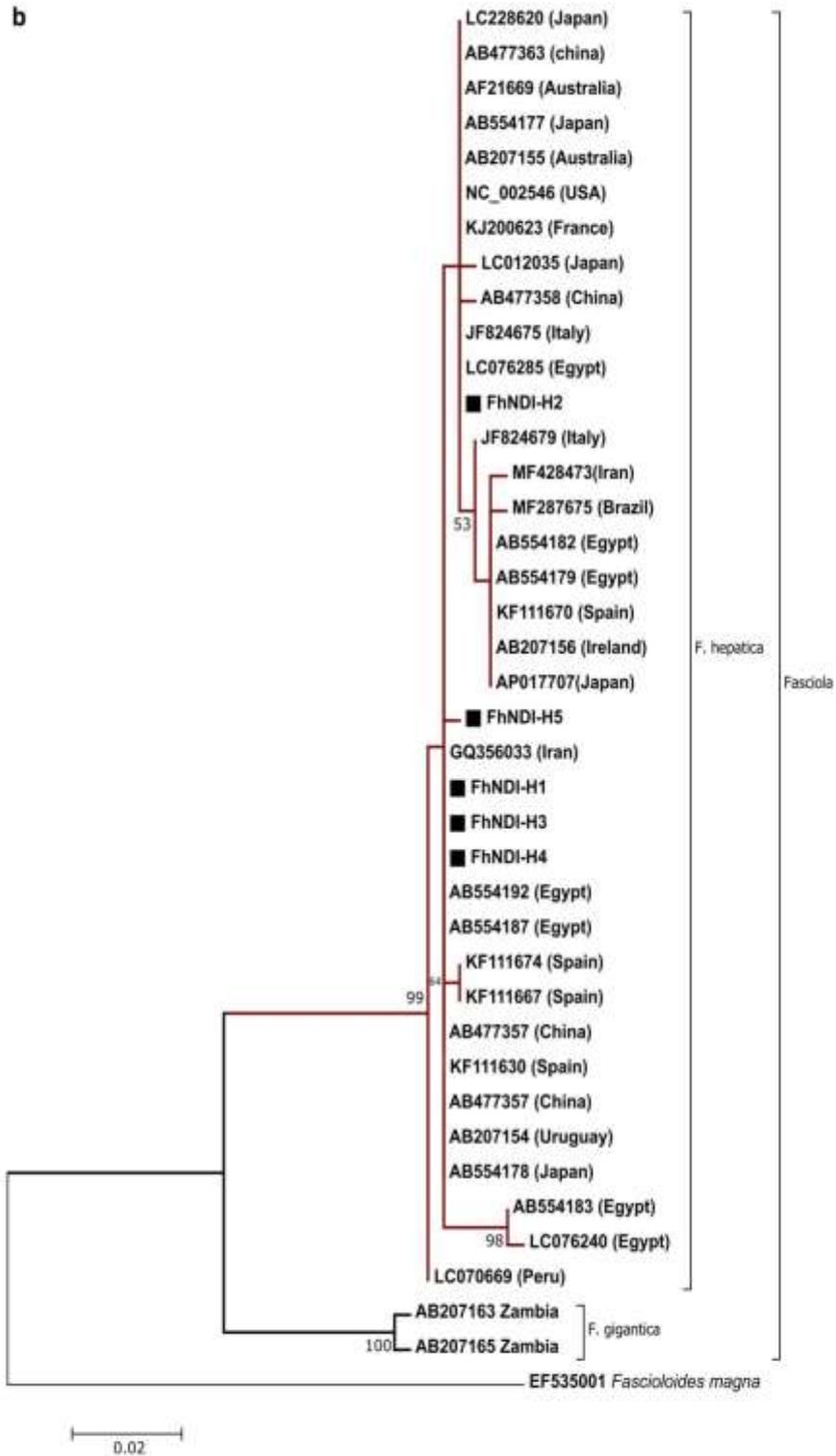
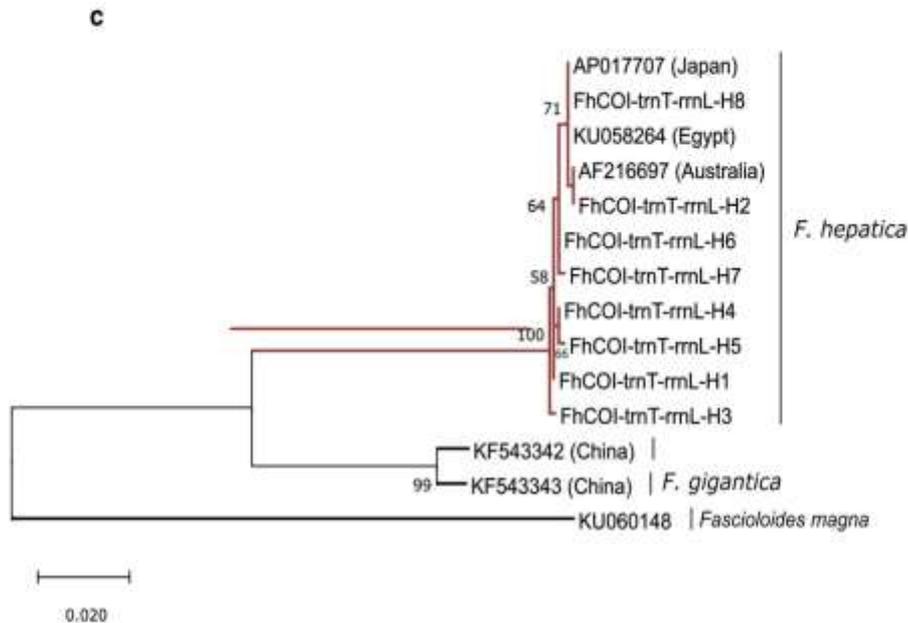


Fig. 4 (continued)



**Fig. 4** (continued)

Beesley et al. (2017) found no significant difference in *Fasciola* diversity. *Fasciola* has wide host range which may allow the maintenance of its genetic diversity in wild animals (Beesley et al. 2017).

The present study provides important results concerning the genetic characterization and variability of *F. hepatica* in Algeria as well as the significant role of cattle importation in shaping the dispersal route of *F. hepatica* worldwide. Fasciolosis appeared common in Algerian cattle from the east to the west. Despite Algerian *Fasciola* flukes suffered from recent FMD outbreak, it seems that the absence of control strategy coupled to the favorable Mediterranean climate may lead to a reconstruction and dispersion of its populations.

Algeria is the largest African country; consequently, further studies of *Fasciola* flukes from different hosts and provinces are essential to better understand their genetic history and to develop specific control measures.

**Funding information** The project was financially supported by the Vice Deanship of Research Chairs, Deanship of Scientific Research of the King Saud University

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## References

Ai L, Weng YB, Elsheikha HM, Zhao GH, Alasaad S, Chen JX, Li J, Li HL, Wang CR, Chen MX, Lin RQ, Zhu XQ (2011) Genetic diversity and relatedness of *Fasciola* spp. isolates from different hosts and

geographic regions revealed by analysis of mitochondrial DNA sequences. *Vet Parasitol* 181(2–4):329–334

Ai L, Cai Y-C, Lu Y, Chen J-X, Chen S-H (2017) Human Cases of Fascioliasis in Fujian Province, China. *Korean J Parasitol* 55(1): 55–60

Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* 19(6):716–723

Alasaad S, Huang CQ, Li QY, Granados JE, Garcia-Romero C, Perez JM, Zhu XQ (2007) Characterization of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA. *Parasitol Res* 101(5):1245–1250

Ali H, Ai L, Song HQ, Ali S, Lin RQ, Seyni B, Issa G, Zhu XQ (2008) Genetic characterisation of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities revealed the existence of *F. hepatica* and *F. gigantica* in Niger. *Parasitol Res* 102(5):1021–1024

Amer S, Dar Y, Ichikawa M, Fukuda Y, Tada C, Itagaki T, Nakai Y (2011) Identification of *Fasciola* species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (ND1 and COI) gene markers. *Parasitol Int* 60(1):5–12

Amer S, ElKhatam A, Zidan S, Feng Y, Xiao L (2016) Identity of *Fasciola* spp. in sheep in Egypt. *Parasit Vectors* 9(1):623

Amor N, Halajian A, Farjallah S, Merella P, Said K, Slimane BB (2011) Molecular characterization of *Fasciola* spp. from the endemic area of northern Iran based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Exp Parasitol* 128:196–204

Arafa WM, Hassan AI, Snousi SAM, El-Dakhly KM, Holman PJ, Craig TM, Aboelhadid SM (2018) *Fasciola hepatica* infections in cattle and the freshwater snail *Galba truncatula* from Dakhla Oasis, Egypt. *J Helminthol* 92:56–63

Aryaeipour M, Bozorgomid A, Kazemi B, Behnia M, Azizi H, Rokni MB (2017) Molecular and morphometrical characterization of *Fasciola* species isolated from domestic ruminants in Ardabil Province, northwestern Iran. *Iran J Public Health* 46(3):318–325

Asadian S, Mohebbali M, Mahmoudi M, Kia EB, Heidari Z, Asgari M, Aryaeipour M, Moradi S, Rokni MB (2013) Seroprevalence of

- human fascioliasis in Meshkin-Shahr district, Ardabil Province, northwestern Iran in 2012. *Iran J Parasitol* 8(4):516–521
- Ashrafi K, Valero MA, Panova M, Periago MV, Massoud J, Mas-Coma S (2006) Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan Iran. *Parasitol Int* 55:249–260
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48
- Bargues MD, Gayo V, Sanchis J, Artigas P, Khoubbane M, Birriel S, Mas-Coma S (2017) DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005352. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005352>
- Beesley NJ, Williams DJL, Paterson S, Hodgkinson JE (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
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 54:165–173
- Camevale S, Malandrini JB, Pantano ML, Soria CC, Rodrigues-Silva R, Machado-Silva JR, Velásquez JN, Kamenetzky L (2017) First genetic characterization of *Fasciola hepatica* in Argentina by nuclear and mitochondrial gene markers. *Vet Parasitol* 245:34–38
- Coghlan A, Tyagi R, Cotton JA, Holroyd N, Rosa BA, Tsai JJ, Laetsch DR, Beech RN, Day TA, Hallsworth-Pepin K, et al (2019) Comparative genomics of the major parasitic worms. *Nat Genet* 51(1):163–174
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9(8): 772
- Dosay-Akbalutla M, Trudgett B, Stanhope M (2005) Understanding genetic diversity of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Z Naturforsch* 60:774–778
- El-Rahimy HH, Mahgoub AM, El-Gebaly NSM, Mousa WM, Antably AS (2012) Molecular, biochemical, and morphometric characterization of *Fasciola* species potentially causing zoonotic disease in Egypt. *Parasitol Res* 111(3):1103–1111
- ElTahawy AS, Bazh EK, Khalafalla RE (2017) Epidemiology of bovine fascioliasis in the Nile Delta region of Egypt: Its prevalence, evaluation of risk factors, and its economic significance. *Vet World* 10(10):1241–1249
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinforma* 1:47–50
- Farjallah S, Sanna D, Amor N, Ben Mehel B, Piras MC, Merella P, Casu M, Curini-Galletti M, Said K, Garippa G (2009) Genetic characterization of *Fasciola hepatica* from Tunisia and Algeria based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Parasitol Res* 105: 1617–1621
- Farjallah S, Ben Slimane B, Piras CM, Amor N, Garippa G, Merella P (2013) Molecular characterization of *Fasciola hepatica* from Sardinia based on sequence analysis of genomic and mitochondrial gene markers. *Exp Parasitol* 135:471–478
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925
- Gabli A, Agabou A, Gabli Z (2015) Brucellosis in nomadic pastoralists and their goats in two provinces of the eastern Algerian high plateaus. *Trop Anim Health Prod* 47(6):1043–1048
- Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SeaView and Phylowin, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543–548
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights for sardines and anchovies and lessons for conservation. *J Hered* 89:415–426
- Hamed N, Ayadi A, Hammami H (2014) Epidemiological studies on fasciolosis in northern Tunisia. *Revue Méd Vét* 165(1–2):49–56
- Hayashi K, Ichikawa-Seki M, Mohanta UK, Singh TS, Shoriki T, Sugiyama H, Itagaki T (2015) Molecular phylogenetic analysis of *Fasciola* flukes from eastern India. *Parasitol Int* 64:334–338
- Hayashi K, Mohanta UK, Neeraja T, Itagaki T (2016) Molecular characterization of *Fasciola gigantica* in Delhi, India and its phylogenetic relation to the species from South Asian countries. *J Vet Med Sci* 78(9):1529–1532
- Ichikawa-Seki M, Ortiz P, Cabrera M, Hobán C, Itagaki T (2016) Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola hepatica* from Peru. *Parasitol Int* 65(3):171–174
- Ichikawa-Seki M, Peng M, Hayashi K, Shoriki T, Mohanta UK, Shibahara T, Itagaki T (2017) Nuclear and mitochondrial DNA analysis reveals that hybridization between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* occurred in China. *Parasitology* 144:206–213
- Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo J, Terasaki K, Shibahara T, Fukuda K (2005) Genetic characterization of parthenogenetic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology* 131(05):679–685
- Januszkiewicz K, Norbury LJ, P Wilkowski, Zawistowska-Demiziak A, Wesolowska A, Wedrychowicz H (2015) Variations in cercarial production and the level of in vitro activation of metacercariae of two different isolates of *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitologica* 60(3): 509–514. <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0072>
- Kardjadj M (2018) History of Foot-and-mouth disease in North African countries. *Vet Ital* 54(1):1–12. <https://doi.org/10.12834/VetIt.928.4711.2>
- Labruna MB, Costa F, Port-Carvalho M, Oliveira A, Souza S, Castro M (2018) Lethal fascioliasis in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *J Parasitol* 104(2):173–176
- Le TH, Blair D, Agatsuma T, Humair PF, Campbell NJ, Iwagami M, Littlewood DT, Peacock B, Johnston DA, Bartley J, Rollinson D, Hemioi EA, Zarlenga DS, McManus DP (2000) Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders—a cautionary tale from the parasitic flatworms. *Mol Biol Evol* 17(7):1123–1125
- Le TH, Nguyen KT, Nguyen NT, Doan HT, Le XT, Hoang CT, De NV (2012) Development and evaluation of a single-step duplex PCR for simultaneous detection of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (family Fasciolidae, class Trematoda, phylum Platyhelminthes). *J Clin Microbiol* 50:2720–2726
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451–1452
- Liu GH, Gasser RB, Young ND, Song HQ, Ai L, Zhu XQ (2014) Complete mitochondrial genomes of the ‘intermediate form’ of *Fasciola* and *Fasciola gigantica*, and their comparison with *F. hepatica*. *Parasit Vectors* 7(1):150
- Lotfy WM, Brant SV, DeJong RJ, Le TH, Demiaszkiewicz A, Rajapakse RP, Perera VB, Laursen JR, Loker ES (2008) Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *Am J Trop Med Hyg* 79(2):248–255
- Martínez-Valladares M, Rojo-Vázquez FA (2014) Intraspecific mitochondrial DNA variation of *Fasciola hepatica* eggs from sheep with different level of anthelmintic resistance. *Parasitol Res* 113(7): 2733–2741
- Mas-Coma S, Bargues MD (1997) Human liver flukes: a review. *Res Rev Parasitol* 57:145–218
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2008) Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Rev Sci Tech* 27(2):443–457
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) Chapter 2, *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 69:41–146

- Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durmi AZ, Saleem MH, Rehman MU, Iqbal MK, Wang Y, Ahmad HI, Abbas T, Hussain R, Ghori MT, Ali S, Khan AU, Li J (2017) A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog* 109:253–262
- Meissonnier E, Mage C (2007) Methods of detection of *Fasciola hepatica* in cattle in France. *Bull Acad Vét France* 160:395–406
- Mekroud A, Benakhlā A, Vignoles P, Rondeleaud D (2004) Preliminary studies on the prevalences of natural fasciolosis in cattle, sheep, and the host snail *Galba truncatula* in north-eastern Algeria. *Parasitol Res* 92:502–505
- Mozeni M, Sharifyzadi H, Izadpanah A (2012) Characterization of *Fasciola hepatica* genotypes from cattle and sheep in Iran using cytochrome C oxidase gene (CO1). *Parasitol Res* 110:2379–2384
- Mucheka VT, Lamb JM, Pfukenyi DM, Mukaratirwa S (2015) DNA sequence analyses reveal co-occurrence of novel genotypes of *Fasciola gigantica* (Fasciolidae; Echinostomida; Trematoda) with *F. hepatica* in South Africa and Zimbabwe. *Vet Parasitol* 214(1–2):144–151
- Nyindo M, Lukambagire AH (2015) Fascioliasis: an ongoing zoonotic trematode infection. *Biomed Res Int* 2015:1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/786195>
- Ohari Y, Hayashi K, Mohanta UK, Kawahara Y, Itagaki T (2017) First report of *Fasciola* larva infection in *Galba truncatula* (Muller, 1774) (Gastropoda, Lymnaeidae) occurring in the natural environment in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 79(8):1381–1383
- Omar MA, Metwally AM, Sultan K (2013) Molecular and phylogenetic status of *Fasciola* sp., of cattle in Qena, Upper Egypt Pak. *J Biol Sci* 16(15):726–730
- Ouchene-Khelifi NA, Ouchene N, Dahmani H, Dahmani A, Sadi M, Douifi M (2018) Fasciolosis due to *Fasciola hepatica* in ruminants in abattoirs and its economic impact in two regions in Algeria. *Trop Biomed* 35(1):181–187
- Peng M, Ichinomiya M, Ohtori M, Ichikawa M, Shibahara T, Itagaki T (2009) Molecular characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol Res* 105(3):809–815
- Righi S, Benakhlā A, Mekroud A, Ouchene N, Sedraoui S (2016) Prevalence of *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula* detected by multiplex PCR in the province of El Tarf (Algeria). *Trop Biomed* 33:149–158
- Rokni M, Mithendi H, Behnia M, Jalalizand N (2010) Molecular characterization of *Fasciola hepatica* isolates by RAPD-PCR and ribosomal ITS1 sequencing. *Iran Red Crescent Med J* 2010(1):27–32
- Rouhani S, Raeghi S, Spotin A (2017) Spermatogenic and phylogenetic characterizations of isolated *Fasciola* Spp. from Cattle, North West Iran. *Pak J Biol Sci* 20(4):204–209
- Samuel AR, Knowles NJ, MacKay DKJ (1999) Genetic analysis of type O viruses responsible for epidemics of foot-and-mouth disease in North Africa. *Epidemiol Infect* 122:529–538
- Sarkari B, Parhoode M, Abdolahi Khabisi S, Shafiei R, Mohammadi-Ghalehbin B (2017) Genetic diversity of *Fasciola* spp. isolates from northern part of Iran: comparison with southwestern isolates. *J Parasit Dis* 41(3):768–772
- Shafiei R, Sarkari B, Sadjjadi SM, MowlaviGh R, Moshfe A (2014) Molecular and Morphological Characterization of *Fasciola* spp. isolated from different host species in a newly emerging focus of human fascioliasis in Iran. *Vet Med Int* 2014:1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/405740>
- Simsek S, Utuk AE, Balkaya I (2011) Molecular differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by PCR-RFLP and DNA sequence analysis. *Helminthologia* 48(1):3–7
- Srairi MT, Benyoucef MT, Kniem K (2013) The dairy chains in North Africa (Algeria, Morocco and Tunisia): from self-sufficiency options to food dependency? *Springer Plus* 162(2):1–13
- Stamatakis A (2006) Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690
- Tajima F (1989) A Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595
- Valero MA, Bargues MD, Calderon L, Artigas P, Mas-Coma S (2018) First phenotypic and genotypic description of *Fasciola hepatica* infecting highland cattle in the state of Mexico, Mexico *Infect. Genet Evol* 64:231–240
- 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
- Wannasan A, Khositharattanakool P, Chaiwong P, Piangjai S, Upanakraw P, Morakote N (2014) Identification of *Fasciola* species based on mitochondrial and nuclear DNA reveals the co-existence of intermediate *Fasciola* sp. and *Fasciola gigantica* in Thailand. *Exp Parasitol* 146:64–70

## First isolation of *Dicrocoelium dendriticum* among cattle in some Northern Algerian slaughterhouses

Linda Chougar, Kh. Harhoura and M. Aissi

Animal Health and Productions Laboratory, High National Veterinary School, B.P.228, Oued Samar, Algiers, Algeria.

**Corresponding author:** Linda Chougar, e-mail: linda.chougar@gmail.com

**Co-authors:** KH: harhourakhaled@yahoo.fr, MA: aissimiriem@yahoo.fr

**Received:** 30-12-2018, **Accepted:** 06-06-2019, **Published online:** 16-07-2019

**doi:** 10.14202/vetworld.2019.1039-1045 **How to cite this article:** Chougar L, Harhoura K, Aissi M (2019) First isolation of *Dicrocoelium dendriticum* among cattle in some Northern Algerian slaughterhouses, *Veterinary World*, 12(7): 1039-1045.

### Abstract

**Background and Aim:** *Dicrocoelium dendriticum* or small liver fluke often causes unnoticed clinical manifestations in cattle. For a live animal, its diagnosis is mainly based on the detection of eggs by coproscopic examination. The objective of this study was to determine the presence or absence of *Dicrocoelium* spp. never previously reported in the study area but also to establish its prevalence, as well as an association between dicrocoeliasis and sex, age and season of the year, and histological characteristics.

**Materials and Methods:** The study was carried out in slaughterhouses of three districts (Bouira, Tizi-Ouzou, and Bejaia) from January 2017 to December 2017. To this end, of 4053 cattle, representing more than 10% of the total number of animals slaughtered, stool and bile samples were collected and a liver inspection was carried out to investigate lesions of distomial cholangitis. They were processed for histological analysis. The specimens were morphologically identified according to the orientation of the testicles, the length and width of the body, and the level of the maximum width of the body.

**Results:** The total prevalence of dicrocoeliasis obtained of the 4053 cattle inspected is 0.52% with a prevalence of 0.66% in Tizi-Ouzou, 0.54% in Bouira, and 0.27% in Bejaia. About 0.52% of livers had distomial cholangitis (21 of the 4053 livers examined had adult *D. dendriticum* and 15% had non-distomial cholangitis. About 0.25% of cattle had *D. dendriticum* eggs in the stool versus 0.52% of cattle had parasite eggs in the bile. Statistical analysis revealed no significant association between dicrocoeliasis infection and the season of the year ( $p > 0.05$ ). However, a significant association was found between dicrocoeliasis infection and sex and age of the animal ( $p < 0.05$ ); females and older animals are more likely to have dicrocoeliasis. Histological analysis of the fluke revealed an anterior positioning of the testicles with a slightly oblique tandem orientation, an average body length of 3.69 mm and an average body width of 1 mm. The maximum body width level is either in the middle of the fluke body or in the rear position.

**Conclusion:** The histological study confirms that the collected fluke is *D. dendriticum*. Thus, this work reveals for the 1<sup>st</sup> time in Algeria the presence of *D. dendriticum* in three districts (Bouira, Tizi-Ouzou, and Bejaia). The results indicate that many cattle farms in the North Central Province of Algeria are infested with *D. dendriticum*.

**Keywords:** bile, cattle, dicrocoeliasis, *Dicrocoelium dendriticum*, liver, stools.

### Introduction

*Dicrocoelium dendriticum*, which causes liver fluke disease in ruminants and is of zoonotic and economic importance. It is prevalent in many regions of the world [1-3]. Although it has been identified in America, Asia, North Africa, and Europe, dicrocoeliasis is a little-known parasitic disease [4]. *D. dendriticum* lives in the adult stage, in the bile ducts, canaliculus, and gallbladder of its hosts (cow, sheep, goat, and pig) [5-7]. Humans can become accidentally infected by swallowing ants on vegetation or on various fruits. Children are, therefore, affected more frequently [8]. From an economic point of view, *D. dendriticum* causes a lot of damage to the livestock industry every year [9].

This parasite, which lives in the liver of its definitive host, involves a gastropod snail as the first intermediate host and an ant as the second intermediate host in its life cycle. Sporocysts and cercariae, which are larval stages of the parasite, live in the hepatopancreas of terrestrial snails, metacercariae are also larval stages, in the abdomen and brain of ants (second intermediate host). The parasite has a slight specificity of the definitive host, with a preference for ruminants, which can be considered as the true host of origin, including mainly sheep and goats, and secondarily large ruminants such as cattle [10]. The number of reports on dicrocoeliasis is increasing in many countries due to the expansion of dry habitats and parasites that have become resistant to anthelmintics [11].

In Algeria, only one study reported the presence of dicrocoeliasis in the Mitidja's area (Northern Algeria) with a prevalence in cattle of 0.07% and 0.86% corresponding to fluke and eggs positive cases [12]. However, no data on dicrocoeliasis have been reported in Tizi-Ouzou, Bouira, and Béjaia (Kabylie region).

Copyright: Chougar, et al. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

This study aimed to investigate the presence and prevalence of microcoeliasis among cattle with histological characteristics in several slaughterhouses from three districts in Northern Algeria and to detect factors associated with *D. dendriticum* infection.

## Materials and Methods

### Ethical approval

The study was not conducted on live animals, but only on animals slaughtered at approved slaughterhouses as a routine slaughtering practice.

### Study area

The studies were carried out in several slaughterhouses from three districts in Northern Algeria: Tizi-Ouzou, Bouira, and Bejaia (Kabylie region). This area is characterized by the Mediterranean climate and is divided by two geographical barriers, the Tell and the Sahara Atlas. Northern Algeria is characterized by a cold winter and a warm summer with heavy rainfall (Figure-1).

### Identification of the animals

Samples were collected daily from January 2017 to December 2017. The selection of slaughterhouses per day was randomly chosen. An investigation report form was completed for each sampled cattle, indicating the origin of the animal, which was determined from information provided by the farmers, the sampling season, sex, and age of the animal, which was determined by dentition and confirmed by the slaughter orientation form signed by the veterinarian. All sampled cattle were categorized into three age groups: <2 years, 2-4 years, and >4 years and finally the appearance of liver during the inspection.

### Collected samples

#### Stool sample

After evisceration of the carcass, 150 g of feces samples were collected from the rectum and placed in a box, then stored in the refrigerator at +4°C until analyzed.

#### Bile sample

Bile was collected by puncturing the gallbladder with a 5 cc syringe. The bile thus collected was stored in the refrigerator at +4°C until it was analyzed.

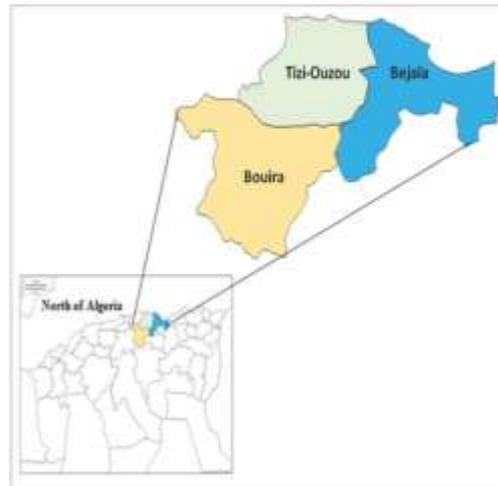
#### Flukes sample

The specimens of *Dicrocoelium* were collected after necrotic inspection of the livers of slaughtered cattle at various slaughterhouses in the North Central Province of Algeria. The specimens were morphologically identified based on the descriptions made by Yamaguti [13], Hinaidy [14], Taira *et al.* [15], Otranto *et al.* [16], and Bourgat *et al.* [17].

### Diagnostic methods

#### Liver inspection at the slaughterhouse

The inspection of the livers took place after total evisceration and cutting of the carcass. It was carried



**Figure-1:** Map of the study area (Bouira, Tizi-Ouzou, and Bejaia). [Source: <https://d-maps.com/index.php?lang=fr>].

out through two mandatory regulatory incisions. The first was broad and superficial located at the level of the large bile ducts at the base of the pallet and the second was short and deep perpendicularly located at the level of the caudate lobe.

#### Stool analysis (coprological analysis)

Coprological analysis was performed by two methods, namely, the sedimentation technique using the Dinnik and Dinnik sedimentation method [18] and the flotation technique based on the Teuscher method [19].

#### Bile analysis

The bile contained in the syringes was transferred into conical tubes. The tubes were centrifuged (at 5000 rpm for 1 min) for 10 min. About 2 ml of the biliary pellet obtained were sucked up with a Pasteur pipette and placed on a slide and covered with a slide. The sample was observed under an optical microscope at 100× and 400× to determine the presence of *D. dendriticum* eggs.

#### Flukes preparation for histology

After collecting the parasites, the flukes were washed with phosphate-buffered saline to remove all traces of bile and were fixed at 10% formalin for at least 24 h by immersing them in 10 times their volume. At the end of this fixation, the histological treatment and coating of the paraffin were carried out using conventional techniques. The sections from 3-4 μm were obtained by microtome of each block and stained with hematoxylin and eosin according to standard histological protocols. The sections were examined and measured with a micrometer.

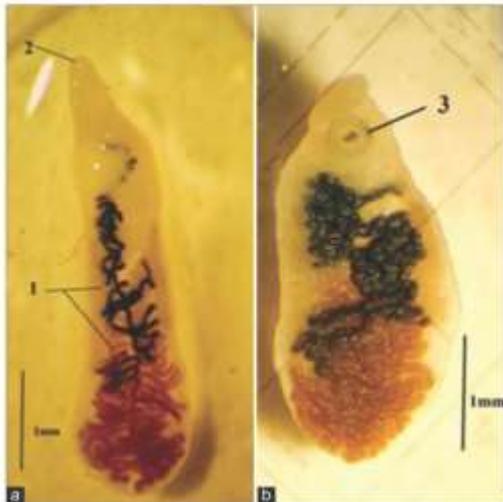
#### Statistical analysis

Data analysis was performed using IBM SPSS Statistics 22.0 software. Tests used the Pearson

Chi-square test. A significant association between animal positivity to dicrocoeliasis and the sex, age, and season of the year was determined if  $p < 0.05$ .

**Results**

The results showed that the total prevalence of dicrocoeliasis was 0.52%, which represents 21 positive cattle of 4053. The parasitized livers presented lesions (Table-1), parasite (Figure-2a and b), and parasite eggs in bile (0.52%) (Figure-3a). However, only 10 (0.25%) of affected cattle revealed the presence of *D. dendriticum* eggs in coprology (Figure-3b and Table-1). The study included 1658 cattle from Tizi-Ouzou region. Among them, 11 (0.66%) were found positive for dicrocoeliasis with the presence of the parasite and eggs. In Bouira Province, of 1304 cattle inspected and analyzed, only 7 cattle (0.54%) were positive for dicrocoeliasis with the presence of the parasite and eggs.



**Figure-2:** Adult *Dicrocoelium dendriticum* observed under a magnifying glass: (a) Adult parasite elongated form; (b) Adult parasite squat form (2: Oral sucker, 1: Uterus, and 3: Ventral sucker) with a translucent body.

Whereas Bejaia Province has the lowest prevalence among the 1091 cattle inspected and analyzed; only 3 cattle (0.27%) were positive for dicrocoeliasis with the presence of eggs and adults of the parasite (Table-1).

**Association between dicrocoeliasis and sex, age, and season**

The risk factors (age, sex, and season) are the same for the three districts (Tizi-Ouzou, Bouira, and Bejaia); therefore, the entire cattle herd in the three districts was selected for the statistical study.

**Season**

Among 0.52% of positive cases, 0.15% were identified in summer, 0.12% in autumn, and 0.22% in spring, compared to a prevalence of 0.02% in winter. No significant association between the positivity of *D. dendriticum* and season was observed ( $p > 0.05$ ) (Table-2).

**Age**

Of the 0.52% of positive cases, 0.25% were aged (>4 years), 0.22% were middle-aged (2-4 years), and 0.05% were young (<2 years). There is a significant association between the positivity of the animal to *D. dendriticum* and the age class ( $p < 0.05$ ) (Table-2).

**Sex**

Of the 0.52% of positive cases, 0.37% were female and 0.15% were male. There is a significant difference according to the animal's sex (male or female) for *D. dendriticum* ( $p < 0.05$ ) (Table-2).

**Morphological measurements**

Table-3 presents the results of the morphological measurements. Flukes' body was flattened, translucent lanceolate, narrower in the anterior region than in the posterior region. The average body length was 3.69 mm and the maximum average body width was 1 mm at the vitelline glands (Vg) or in the posterior part of the body. Its integument is smooth (Teg) (Figure-4d).

The oral sucker (Os) was round and located at the anterior end of the body (Figure-4b). The mean

**Table-1:** Summary of different diagnostic techniques in the three districts (Bouira, Tizi-Ouzou, and Béjaia).

Pathological	Wilayas			
	Bejaia n (%)	Tizi-Ouzou n (%)	Bouira n (%)	Total n (%)
Bile analysis				
+ <sup>c</sup>	3 (0.27)	11 (0.66)	7 (0.54)	21 (0.52)
- <sup>d</sup>	1088 (99.7)	1647 (99.3)	1297 (99.4)	4032 (99.48)
Coproscopic analysis				
+ <sup>e</sup>	2 (0.18)	5 (0.3)	3 (0.23)	10 (0.25)
- <sup>d</sup>	1089 (99.8)	1653 (99.7)	1301 (99.7)	4043 (99.75)
Liver inspection				
Chol+dist+ <sup>a</sup>	3 (0.27)	11 (0.66)	7 (0.54)	21 (0.52)
Chol+dist- <sup>b</sup>	167 (15.3)	312 (18.8)	130 (9.96)	609 (15)
Healthy	921 (84.4)	1335 (80.5)	1167 (89.5)	3423 (84.46)

<sup>a</sup>Chol+dist+=Distomian cholangitis (inflammation of the bile ducts with the presence of the parasite),

<sup>b</sup>Chol+dist-=Non-distomian cholangitis (inflammation of the bile ducts without the presence of the parasite),

<sup>c</sup>(+)=Presence of eggs of *Dicrocoelium dendriticum*, <sup>d</sup>(-)=Absence of eggs of *D. dendriticum*

**Table-2:** Summary of positive cases according to risk factors (seasons, sex, and age).

Risk factors	Infection	
	+	-
Seasons		
Autumn	5 (0.12)	1034 (25.5)
Winter	1 (0.025)	1003 (24.74)
Spring	9 (0.22)	1016 (25.1)
Summer	6 (0.15)	979 (24.15)
Sex		
Male	6 (0.15)	3534 (87.2)
Female	15 (0.37)	498 (12.3)
Age (years)		
Aged (>4)	10 (0.25)	319 (7.87)
Intermediate (2-4)	9 (0.22)	1090 (26.9)
Young (<2)	2 (0.05)	2623 (64.7)

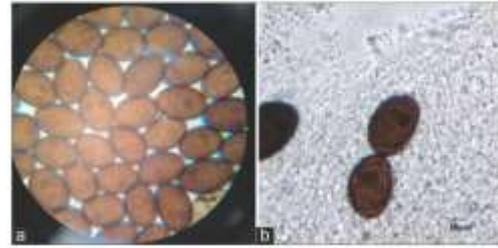
**Table-3:** Morphometric data of *Dicrocoelium dendriticum* (from cattle).

Body/organs	Items	<i>Dicrocoelium dendriticum</i> (µm)	
		Minimum-Maximum	Mean
Body	Length	2600-4600	3690
	Width	1000-1200	1000
Oral sucker	Diameter	90-111	103.66
Ventral sucker	External	245-285	271.76
	Diameter	102-120	113.19
	internal	312-366	344
	External		
Testes	Length	250-300	272.14
	Width	480-580	537.42
Ovary	Length	90-115	107
	Width	180-285	230
Vitelline glands	Length	855-1500	1107.71
Eggs in the uterus	Length	31.6-38.8	34.19
	Width	20.8-25.6	22.44
Cirrus pouch	Length	420-450	439
	Width	120-140	135.04
Ootype	Length	60.2-67.9	65.5
	Width	102-111	105.9

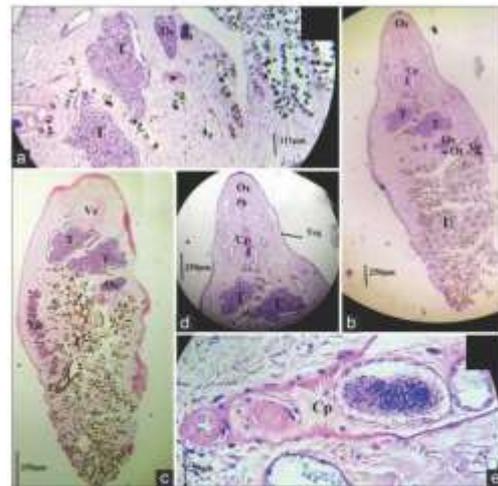
external diameter of the buccal sucker was 271 µm. Under the buccal sucker, a small round pharynx (Ph) (60 µm) followed by a fine esophagus was observed (Figure-4d). The ventral sucker (Vs) was round and the mean external diameter was 344 µm (Figure-4c).

The two globular testicles (T) were located immediately after the Vs, are arranged in slightly oblique tandem orientation so that their size varied from 250 to 300 µm for length and 480 to 580µm for width (Figure-4a-d). The posture of the cirrus pouch (Cp) was voluminous and elongated axial (420-450 µm) (Figure-4c). Figure-4 also shows that the smallest ovary (Ov) was located directly behind the testicle and that the ootype (Ot), measuring 60.2-67.9 µm long, was located at the bottom of the ovary (Figure-4a).

The Vg (855-1500 µm) occupied 1/3 of the parasite body in a central position and did not reach the posterior edge of the ovary (Figure-4c). The uterus (U)



**Figure-3:** Numerous eggs of *Dicrocoelium dendriticum* in bile and stools observed under an optical microscope (Gr. 1000×). (a): Parasite eggs in the bile, (b): Parasite eggs in the stool (the egg is globally ellipsoidal (asymmetrical), dark brown in color and capped).



**Figure-4:** Histological section of an adult of *Dicrocoelium dendriticum*: (a) Histological section of the middle part of the parasite; (b) Complete histological section of the parasite "dorsal face;" (c) Complete histological section of the parasite "ventral face;" (d) Histological section of the anterior parasite; (e) Histological section of the cirrus pouch. (Cp: Cirrus pouch, Os: Oral sucker, Vs: Ventral sucker, T: Testes, Ov: Ovary, Ot: Ootype, Ph: Pharynx, U: Uterus filled with brown eggs of parasites (Eg), Teg: Its tegument is smooth).

occupied the posterior 2/3 of *Dicrocoelium* spp. body, characterized by numerous convolutions (Figure-4c).

The eggs (Eg) were ellipsoidal, slightly asymmetric, measuring 31.6-38.8 µm long and 20.8-25.6 µm wide. They occupied the entire part of the uterus with a very light brown color in the posterior part of the parasite. In the anterior part, they were very dark brown and mature with a small operculum on one pole and surrounding two lighter vesicles on the opposite pole (Figure-4c).

#### Discussion

During this study, *D. dendriticum* was found for the 1<sup>st</sup> time in some slaughterhouses in the Northern

Province of Algeria, namely Bejaia, Tizi-Ouzou, and Bouira with a prevalence of 0.27%, 0.66%, and 0.54%, respectively, for a total prevalence of 0.52%. The results are consistent with those obtained by many authors with dicrocoeliasis prevalences increasing from 1.47, 1.76, and 2.10% in 1999-2000 to 0.69, 0.34, and 0.25% in 2003-2004 in cattle, sheep, and goats successively [20].

In addition, 1, 0.8, and 1% of livers seized due to *D. dendriticum* in sheep, goats, and cattle, respectively, were reported in Western Iran [21]. In Arak, Iran, Arbabi *et al.* [22] indicated a prevalence of 0.77% in cattle, goats, and sheep. While in the Mitidja region of Algeria, a prevalence of 0.07% and 0.86% in cattle was recorded, corresponding, respectively, to flukes and eggs positive cases [12].

Other authors have noted higher prevalences, notably Schweizer *et al.* [23], with 47.2% of cases of dicrocoeliasis in Swiss farm cattle; Jithendran and Bhat [24] found 8.1% of sheep and 4.1% of goats positive for dicrocoeliasis in India; in Northern Niger, the prevalence of dicrocoeliasis was 56% in cattle, 13.1% for sheep, and 5.2% for goats [25]. Asanji and Williams [26] reported that 61.8% of cases of in cattle in Sierra Leone; Aminzare *et al.* [27] found that 5.95% of livers of sheep and goats slaughtered at the Nishapur slaughterhouse were condemned.

Coprosopic analysis detected the presence of *D. dendriticum* eggs in only 10 cattle, a prevalence of 0.25%. These results are comparable to those obtained by Levasseur [28] who showed a low fecal excretion of *Dicrocoelium* eggs in cattle, with a number of PGOs ranging from 0 to 250, and an average close to 15, which very often makes the diagnosis false negative.

Other authors reported higher prevalences. In Italy, Cringoli *et al.* [29], according to a coprological study of 81 cattle and 197 sheep farms, reported that 53.1% of cattle farms (43 of 81 farms) were positive for *Dicrocoelium* (16% of animals) and 133 of 197 sheep farms (67.5%) were positive for *D. dendriticum*. Bihaji *et al.* [30] also noted a prevalence of 3.44% of *Dicrocoelium* spp. in goats in India based on a coprological study.

#### Association between dicrocoeliasis and sex, age, and season

The statistical analysis revealed no significant association between dicrocoeliasis and season ( $p > 0.05$ ), with a higher prevalence in spring (0.22%), followed by summer (0.15%), autumn (0.12%), and finally winter (0.025%).

The results are comparable to those obtained by Arbabi *et al.* [22] who reported no significant association between dicrocoeliasis and the season of the year. However, other authors have reported results with a significant association between season and dicrocoeliasis in sheep, cattle, and goats in Western Iran ( $p < 0.001$ ). Hepatic condemnations due to dicrocoeliasis were frequent in autumn for sheep and cattle and in winter for goats [21].

This difference with the results of the present study may be caused by different environmental conditions. Iran is generally an arid country, but the west and north are rainier than the east and south. While Northern Algeria has a Mediterranean climate, summers are hot and dry and winters are warm and rainy and sometimes snowy.

On the other hand, the results also showed a significant association between dicrocoeliasis and sex, age of animal ( $p < 0.05$ ); of 513 (12.6%) females, 15 (0.37%) were positive and of 3540 (87.3%) males, only 6 (0.15%) were positive, so females seem much more vulnerable to this disease.

This could be due, on the one hand, to their longer lifespan than males, which makes them more exposed to meadow and disease development, their physiology (gestation and lactation) leading to a reduction in immunity and more sensitive to parasitic diseases.

On the other hand, the female breeding methods used by farmers in Tizi-Ouzou, Bouira, and Bejaia Provinces are often extensive. Females tend to graze and therefore to be more exposed and infested, unlike males, whose breeding is often intensive because they are intended for fattening. In addition, the nature of their diet often consists of cereals in seed or ground, which exposes them to a lower risk of infestation.

With regard to the age factor, there seems to be a direct link with the sex factor, as males are slaughtered at a younger age, unlike females whose slaughter before 5 years is prohibited, except in the case of emergency and stamping out. The results obtained are comparable to those of Bihaji *et al.* [30] who reported a higher incidence of gastrointestinal helminths among females than among males.

Dicrocoeliasis affecting cattle causes economic losses due to decreased milk production, reduced carcass weight, possible sterility, infertility, and finally seizure of parasitized livers at the slaughterhouse [8].

Histological analysis of *Dicrocoelium* shows that the flukes collected in Algeria are *D. dendriticum* of the anterior positioning of the testicles in tandem or slightly oblique unlike *D. chinensis*, which are in bilateral position [16], and the maximum width of the body is in the middle or in the posture of the body.

The parasite body is flat and translucent revealing all organs. The results show shorter parasite sizes ranging from 2.8 to 4.5 mm, which differs from the more elongated *Dicrocoelium hospes* [17].

#### Conclusion

This work aimed to determine the presence or absence of *D. dendriticum* never reported before in Algeria. The results revealed the presence of *D. dendriticum* in three districts: Tizi-Ouzou, Bejaia, and Bouira. Its low prevalence confirms the beginning of the introduction of the parasite in Algeria, which could increase in the coming years if no measures are taken.

The province of Tizi-Ouzou has the highest rate of infested cattle followed by Bouira and finally Bejaia. In addition, the results show that females and older animals are more likely to be affected by dicrocoeliasis. Animals with several years of grazing are more likely to excrete *D. dendriticum* eggs than those in the 1<sup>st</sup> year of grazing.

Many studies on dicrocoeliasis among different bovine, sheep, and goat species must be carried out in Algeria both on its prevalence and its epidemiology. In particular, molecular identification of the small fluke would be useful to determine the presence of intraspecific variation of the species present in Algeria.

#### Authors' Contributions

LC and KH carried out the inspection of cattle livers in the different slaughterhouses, LC collected the samples (stools and bile) and performed the experiments. LC and MA realized the coprological and bile analysis; LC performed the histological analysis and analyzed the data. LC drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

We would like to thank the veterinarians and workers at the different slaughterhouses for their precious help during the study. This work was financially supported by the Laboratory Research Animal Health and Production, Superior National Veterinary School, Algiers, Algeria.

#### Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Publisher's Note

Veterinary World remains neutral with regard to jurisdictional claims in published map and institutional affiliation.

#### References

- Khanjari, A., Bahonar, A., Fallah, S., Bagheri, M., Alizadeh, A., Fallah, M. and Khanjari, Z. (2014) Prevalence of fasciolosis and dicrocoeliasis in slaughtered sheep and goats in Amol abattoir, Mazandaran, Northern Iran. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 4(2): 120-124.
- Kantzoura, V., Kouam, M.K., Feidas, H., Teofanova, D. and Theodoropoulos, G. (2011) Geographic distribution modelling for ruminant liver flukes (*Fasciola hepatica*) in South-Eastern Europe. *Int. J. Parasitol.*, 41(7): 747-753.
- Shinggu, P.A., Olufemi, O.T., Nwuku, J.A., Babu-Onoja, E.B.T. and Iyawa, P.D. (2019) Liver flukes egg infection and associated risk factors in white fulani cattle slaughtered in Wukari, Southern Taraba State, Nigeria. *Adv. Prev. Med.*, 2019: 2671620.
- Otranto, D. and Traversa, D. (2002) A review of dicrocoeliasis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.*, 107(4): 317-335.
- Jeandron, A., Rinaldi, L., Abdylatjeva, G., Usabalieva, J., Steinmann, P., Cringoli, G. and Utzinger, J. (2011) Human infections with *Dicrocoelium dendriticum* in Kyrgyzstan: The tip of the iceberg. *J. Parasitol.*, 97(6): 1170-1172.
- Beck, M.A., Goater, C.P. and Colwell, D.D. (2015) Comparative recruitment, morphology and reproduction of a generalist trematode, *Dicrocoelium dendriticum*, in three species of host. *Parasitology*, 142(10): 1297-1305.
- Ofori, M., Bogoch, I.I. and Ephraim, R.K. (2015) Prevalence of *Dicrocoelium dendriticum* ova in Ghanaian school children. *J. Trop. Pediatr.*, 61(3): 229-230.
- Duchacek, L. and Lamka, J. (2003) Dicrocoeliasis the present state of knowledge with respect to wildlife species. *Acta Vet. Brno*, 72(4): 613-626.
- Naemipour, M., Hashemitabar, G.R., Dastjerdi, K., Mojaver, M.J. and Mohammadi, H.R. (2016) Comparison of fecal egg counts and ELISA for the diagnosis of *Dicrocoelium dendriticum*. *Pol. J. Vet. Sci.*, 19(3): 573-580.
- Mas-Coma, S., Rodriguez, A., Bargaes, M.D., Valero, M.A., Coello, J.R. and Angles, R. (1997) Secondary reservoir role of domestic animals other than sheep and cattle in fascioliasis transmission in the Northern Bolivian altiplano. *Rev. Parasitol.*, 57(1): 39-46.
- Gürel, G. (2017) Importance of land snails in dicrocoeliasis epidemiology. *Türk. Parasitol. Derg.*, 41(3): 169-172.
- Chaouadi, M., Harhoura, K., Aissi, M., Boutellis, A. and Tazerouti, F. (2018) First abattoir report on bovine dicrocoeliasis from Algiers (Algeria). *Veterinaria*, 67(3): 145-147.
- Yamaguti, S. (1971) Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Keigaku Publishing, Ltd., Tokyo, p1073.
- Hinaidy, H.K. (1983) *Dicrocoelium suppereri* nomen novum (syn. *D. orientalis* Sudarikov et Ryjnikov 1951), a new trematode for the parasite fauna of Austria. *Zentralbl. Veterinärmed. B*, 30(8): 576-589.
- Taira, K., Shirasaka, S., Taira, N., Ando, Y. and Adachi, Y. (2006) Morphometry on lancet flukes found in Japanese sika deer (*Cervus nippon centralis*) captured in Iwate prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 68(4): 375-377.
- Otranto, D., Rehbein, S., Weigl, S., Cantacessi, C., Parisi, A., Lia, R.P. and Olson, P.D. (2007) Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjnikov, 1951) tang and tang, 1978 (*Platyhelminthes: Digeneta*). *Acta Trop.*, 104(2-3): 91-98.
- Bourgat, R., Seguin, D. and Bayssade, D.C. (1975) Données nouvelles sur *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907: Anatomie de l'adulte et cycle évolutif. Note préliminaire. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 50(6): 701-713.
- Dinnik, J.A. and Dinnik, N.N. (1963) A method for the simultaneous diagnosis of schistosomiasis, fascioliasis and paramphistomiasis in cattle. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 11(1): 29-36.
- Teuscher, E. (1965) A new single method of examining feces for the diagnosis of helminth diseases of ruminant. *Zentralbl. Veterinärmed. B*, 12(3): 241-248.
- Ansari-Lari, M. and Moazzeni, M. (2006) A retrospective survey of liver fluke disease in livestock based on abattoir data in Shiraz, South of Iran. *Prev. Vet. Med.*, 73(1): 93-96.
- Shabbazi, Y., Hashemnia, M. and Safavi, E.A. (2016) A retrospective survey of liver flukes in livestock based on abattoir data in Kermanshah, West of Iran. *J. Parasit. Dis.*, 40(3): 948-953.
- Arbabi, M., Nezami, E., Hooshyar, H. and Delavari, M. (2018) Epidemiology and economic loss of fasciolosis and dicrocoeliasis in Arak, Iran. *Vet. World*, 11(12): 1648-1655.
- Schweizer, G., Plehani, G.F. and Braun, U. (2003) Prevalence of *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum* in the cow: Inspection in an East Switzerland abattoir. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 145(4): 177-179.
- Jithendran, K.P. and Bhat, T.K. (1996) Prevalence of dicrocoeliasis in sheep and goats in Himachal Pradesh, India. *Vet. Parasitol.*, 61(3-4): 265-271.
- van Veen, T.W.S., Folaranmi, D.O., Usman, S. and Ishaya, T. (1980) Incidence of liver fluke infections (*Fasciola gigantica* and *Dicrocoelium hospes*) in ruminants in Northern Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.*, 12(2): 97-104.
- Asanji, M.F. and Williams, M.O. (1984) The effect of sex on seasonal variation in single and double infection of

- cattle in Sierra Leone by *Dicrocoelium hospes* and *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.*, 15(3-4): 247-255.
27. Aminzare, M., Hashemi, M., Faz, S.Y., Raesi, M. and Hassanzadazar, H. (2018) Prevalence of liver flukes infections and hydatidosis in slaughtered sheep and goats in Nishapur, Khorasan Razavi, Iran. *Vet. World*, 11(2): 146-150.
28. Levasseur, G. (2002) La dicrocoeliose bovine: Suivi de l'excrétion pendant l'hiver. *Bull. GTP*, 13: 137-139.
29. Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G. and Malone, J.B. (2002) A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the Southern Italian Apennines. *Vet. Parasitol.*, 108(2): 137-143.
30. Bihagi, S.J., Allai, I.M., Banday, M.A.A., Wani, Z.A. and Shahardar, R.A. (2017) Prevalence of caprine GI helminths in temperate areas of Jammu and Kashmir. *J. Parasit. Dis.*, 41(3): 843-849.

\*\*\*\*\*

## ATTESTATION DE PARTICIPATION

**13<sup>èmes</sup>** Journées Internationales des Sciences Vétérinaires  
**Sécurité alimentaire : Enjeux et Stratégies**  
Le **01 & 02** décembre **2018**

Je soussigné Pr BOUYOUCEF Abdallah, président des 13<sup>èmes</sup> Journées Internationales des Sciences Vétérinaires sur la sécurité alimentaire : Enjeux et Stratégies, atteste que :

**Linda CHOUGAR**

a participé avec une communication orale, intitulée : « Prévalence et facteurs de risques de la distomatose hépatique à Fasciolahepatica chez les bovins abattus au niveau des abattoirs d'Ouzellaguen et Akbou »

Co-auteurs : Harhoura K.H., Aïssi M



Pr Bouyoucef A.

## 1<sup>er</sup> Colloque International d'Ecophysiologie Animale et Biodiversité

Maison de la Science, USTHB

Alger, Algérie du 22 au 23 Novembre 2016

Je soussignée, Professeur F. KHAMMAR, présidente du colloque, atteste que :

### CHOUGAR Linda

**Co-auteur**: Harhoura K., Aggad H., Aissi M., Zait H. et Hamrioui B.

**A participé avec une communication affichée intitulée :**  
La prévalence de la Fasciolose bovine a *Fasciola hepatica* par le diagnostic sérologique et inspection  
des foies au niveau des abattoirs de la wilaya de Tizi-Ouzou.

وزارة العلوم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur Alger, le 23 Novembre 2016  
جامعة هواري بومدين للعلوم والتكنولوجيا  
Ministère de la Recherche Scientifique  
Technologie Houari Boumediene  
Laboratoire de Recherches Zones Arides

Présidente du Colloque





V<sup>ème</sup> Congrès International de  
Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources

## ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du V<sup>ème</sup> congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR), tenu à Tabarka - Tunisie, du 22 au 25 mars 2017, atteste que :

**CHOUGAR LINDA**

*a participé activement aux journées et a présenté la communication orale intitulée :*

**Etude comparative de trois techniques de diagnostic de la Distomatose hépatique chez les bovins abattus au niveau de deux abattoirs (Thala-Athman et Tamda) en Algérie**

CHOUGAR, L.<sup>1</sup>, HARHOURA KH.<sup>1</sup>, AGGAD H.<sup>2</sup>, AISSI M.<sup>1</sup>, CHAOUADI M.<sup>3</sup>, ZAIT H.<sup>4</sup>, HAMRIOUI B.<sup>4</sup>

Le Comité d'organisation



V<sup>ème</sup> Congrès International de  
Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources

## ATTESTATION DE PARTICIPATION

*Le comité d'organisation du V<sup>ème</sup> congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR), tenu à Tabarka - Tunisie, du 22 au 25 mars 2017, atteste que :*

**CHOUGAR LINDA**

*a participé activement aux journées et a présenté la communication par affiche intitulée :*

**PREVALENCE ET EVALUATION DES PERTES ECONOMIQUES DE LA FASCIULOSE  
(INFESTATION PAR FASCIOLA HEPATICA) CHEZ LES BOVINS ABATTUS AUX  
ABATTOIRS DE LA WILAYA DE TIZI-OUZOU (ALGERIE)**

**CHOUGAR, L., HARHOURA KH., AGGAD H., AISSI M., CHAOUADI M., ZAIT H.,  
HAMRIOUI B.**

*Le Comité d'organisation*



# Société Algérienne de Parasitologie et Mycologie Médicales

En Partenariat avec



## Attestation de Communication

Mme.....**Linda Chougar** .....

A participé aux 3<sup>èmes</sup> journées francomaghrébines de Parasitologie et Mycologie, les 24,25 et 26 octobre 2017 à Alger, en présentant une communication affichée intitulée :

**« Prévalence et facteurs de risques de la fasciolose à Fasciola hepatica chez les bovins abattus au niveau de la wilaya de Bouira»**

Coauteurs : K. Hameg, L. Lassal, K. Harhouira, M. Aissi & M. Chaouadi

Le Secrétaire Général de la SAPMM



# *Société Algérienne de Parasitologie et Mycologie Médicales*



## *Attestation de Communication*

Mme ..... *Linda Chougar* .....

A participé à la XX<sup>ème</sup> journée nationale de Parasitologie-Mycologie, le 19 mai 2016 à la faculté de médecine d'Alger « Ziana », en présentant une communication orale intitulée :

### *Prévalence de la fasciolose bovine à Fasciola hepatica au niveau des abattoirs de Tizi-Ouzou*

Co-auteurs : Harfoura, K, Aggad, H, Aissi, M, Zait, H Et Hamrioui, B

Le secrétaire général de la SAPMM

La présidente de la SAPMM





INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES TIARET

معهد علوم البيطرة تيارت



## Attestation de participation

Le directeur de l'Institut des sciences vétérinaires de Tiaret  
Et le club Er-Razi Attestent que :

Chougar L., Harhoura Kh., Aggad H., Aissi M., Zait H. et Hamrioui B.

A participé dans la première journée de parasitologie, organisée le 18/04/2016 sous le thème:

« Prévalence de la fasciolose des bovins abattus au niveau de l'abattoir de  
Tiaret »





République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou  
Association Scientifique « Iger n Tussna », Iguer Adloune



## Attestation De Participation

Le laboratoire Qualité et Sécurité des Aliments et l'association scientifique Iger n Tussna, ont l'honneur de décerner cette attestation à Mme. **CHOUGAR Linda** pour avoir présenté une communication affichée (poster) intitulée :

**Prévalence de la distomatose hépatique à Fasciola hepatica chez les bovins abattus au niveau des abattoirs de la wilaya de Béjaïa avec la mise en évidence des différents facteurs de risques de la parasitose,**

à l'occasion du 2ème Séminaire National sur la Nutrition et la Santé Publique organisé les 21 et 22 septembre 2018 à Ait Toudert, Tizi-Ouzou.

Co-auteurs: HARHOURA Khaled, AISSI Miriem.

*Cette attestation est établie afin de servir et valoir ce que de droit.*

Comité Scientifique  
Dr. AMRUCHE Tahar



Comité d'Organisation  
M. AIT AMARIA Younes





République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou  
Association Scientifique « Iger n Tussna », Iguer Adloune



## Attestation De Premier Prix

Le laboratoire Qualité et Sécurité des Aliments et l'Association Scientifique Iger n Tussna, ont l'honneur de décerner cette attestation à Mme. **CHOUGAR Linda** pour avoir remporté le premier prix de la meilleure communication, intitulée :

**Prévalence de la distomatose hépatique à Fasciola hepatica chez les bovins abattus au niveau des abattoirs de la wilaya de Béjaïa avec la mise en évidence des différents facteurs de risques de la parasitose,**

à l'occasion du 2ème Séminaire National sur la Nutrition et la Santé Publique organisé les 21 et 22 septembre 2018 à Ait Toudert, Tizi-Ouzou.

Co-auteurs: HARHOURA Khaled, AISSI Miriem.

*Cette attestation est établie afin de servir et valoir ce que de droit.*

Comité Scientifique

Dr. AMROUCHE Tahar



Comité d'Organisation

M. AIT AMARA Younes



# SNNSP18

## Annexe 2

### FICHE d'enquête

Prélèvements effectués sur des bovins au niveau des abattoirs.

Date du prélèvement :

numéro de prélèvement :

Localisation géographique du prélèvement :

Wilaya :

Identification du bovin :

Race :

Age : jeune (-2ans) , intermédiaire (2-4ans)  , âgé (+4ans)

Sexe :

Type d'élevage :

Élevage extensif :

Élevage intensif :

Mini-élevage (familiale)

Environnement :

Accès aux fossés : oui  non

Accès aux marres : oui  non

Présence de limnées : oui  non

Origine de l'aliment que vous ramenez

Lieu : Humide Oui  Non  Je ne sais pas

Symptomatologie :

Etat général :

Fatigue       anorexie       asthénie       RAS

**Production :**

Production normal :

Baisse de la production :

**Traitement :**

Administration d'anthelminthiques :      oui       non

Date d'administration :

**Inspection du foie :**

Foie sain :

Présence de cholangite non distomienne :

Présence de cholangite distomienne :

Autre signe pathologique :.....

## Annexe 3

### Extraction de l'ADN de *Fasciola hepatica*

1. Ajouter 600 µl de solution de lyse de noyaux dans un tube à centrifuger de 1,5 ml et refroidir sur de la glace.

2. Ajouter 10 à 20 mg de tissu frais (partie latérale des douves) ou décongelé à la solution de lyse de noyaux refroidie et homogénéiser pendant 10 secondes.

3-en utilisant un petit homogénéisateur. Transférer le lysat dans un tube à centrifuger de 1,5 ml.

3-1. Alternativement, broyer le tissu (avec des ciseaux) dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon préalablement refroidis à l'azote liquide. Après broyage, permettre à l'azote liquide de s'évaporer et transférer environ 10 à 20 mg de tissu broyé dans 600 µl de solution de lyse de noyaux dans un tube à centrifuger de 1,5 ml.

4-Incuber le lysat à 65 ° C pendant 15 à 30 minutes.

4-1-Ajouter 3 µl de solution RNase au lysat nucléaire et mélanger l'échantillon en inversant le Tube 2 à 5 fois. Incuber le mélange pendant 15 à 30 minutes à 37 ° C. Laisser l'échantillon refroidir à la température ambiante pendant 5 minutes avant de continuer.

5. Ajouter 200 µl de solution de précipitation protéique et vortexer vigoureusement à haute vitesse pendant 20 secondes. Refroidissez l'échantillon sur de la glace pendant 5 minutes.

6. Centrifuger pendant 4 minutes à 13 000-16 000 × g. La protéine précipitée formera un culot blanc serré.

7. Retirez délicatement le surnageant contenant l'ADN (en laissant le culot de protéines derrière) et transférez-le dans un Microtube à centrifuger de 1,5 ml contenant 600 µl d'isopropanol à température ambiante.

Remarque: Il peut rester du surnageant dans le tube d'origine contenant le culot de protéines. Laisser ce liquide résiduel dans le tube pour éviter de contaminer la solution d'ADN avec la protéine précipitée.

8. Mélangez doucement la solution par inversion jusqu'à ce que les brins d'ADN en forme **de fil blanc forment une masse visible**.

9. Centrifuger pendant 1 minute à une température de 13 000 à 16 000 × g à la température ambiante. L'ADN sera visible comme un petit blanc pastille. jeter soigneusement le surnageant.

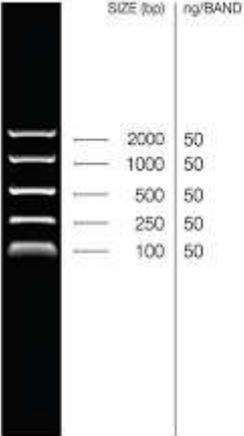
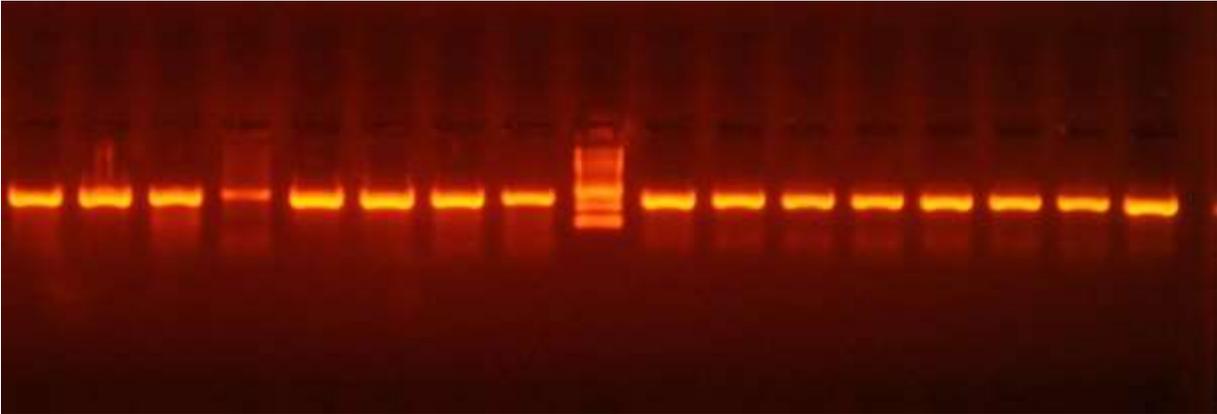
10. Ajoutez 600 µl d'éthanol à 70% à température ambiante et inversez doucement le tube à plusieurs reprises pour laver l'ADN.

Centrifuger pendant 1 minute à une température comprise entre 13 000 et 16 000 × g à la température ambiante.

11. Aspirez soigneusement l'éthanol à l'aide d'une pipette Pasteur à tirage ou d'un embout de pipette de séquençage. Le culot d'ADN est très lâche à ce stade, et il faut faire attention à ne pas aspirer le culot dans la pipette.
12. Retournez le tube sur du papier absorbant propre et laissez sécher le culot à l'air pendant 10 à 15 minutes.
13. Ajouter 100 µl de solution de réhydratation de l'ADN et réhydrater l'ADN en incubant à 65 ° C pendant 1 heure. Périodiquement mélanger la solution en tapotant doucement le tube. Sinon, réhydrater l'ADN en incubant la solution pendant une nuit à température ambiante ou à 4 ° C.
14. Conservez l'ADN entre 2 et 8 ° C.

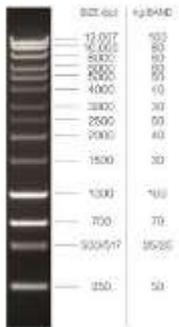
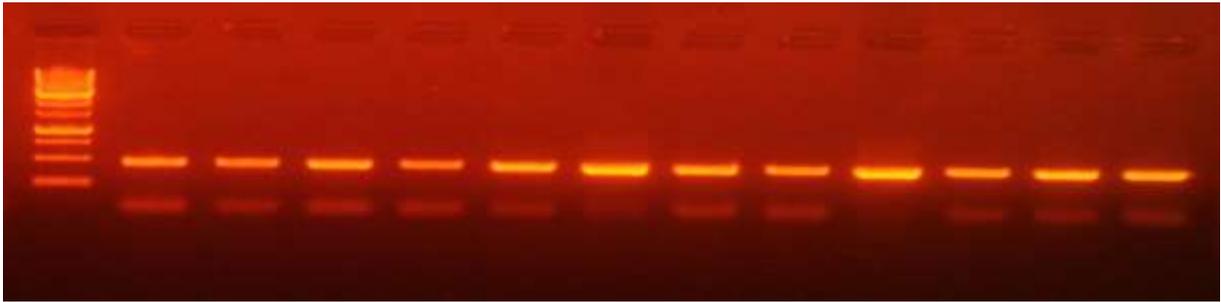
# Annexe 4

COI 391 bp



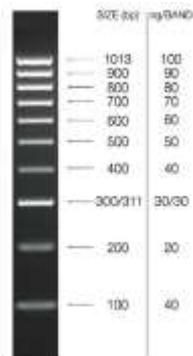
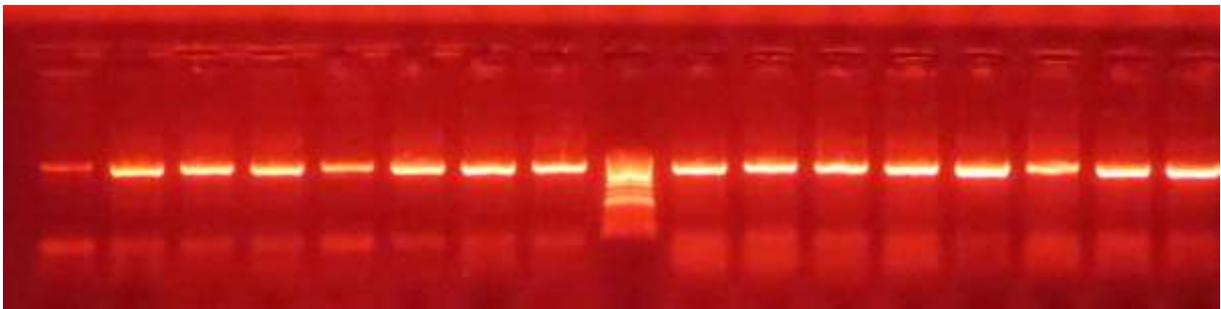
[EasyLadder I - Bioline](#)

NADI 525 bp



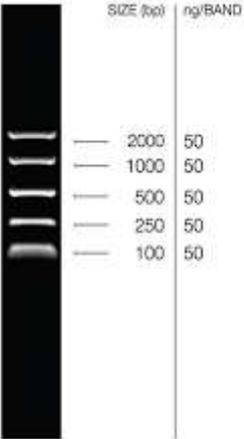
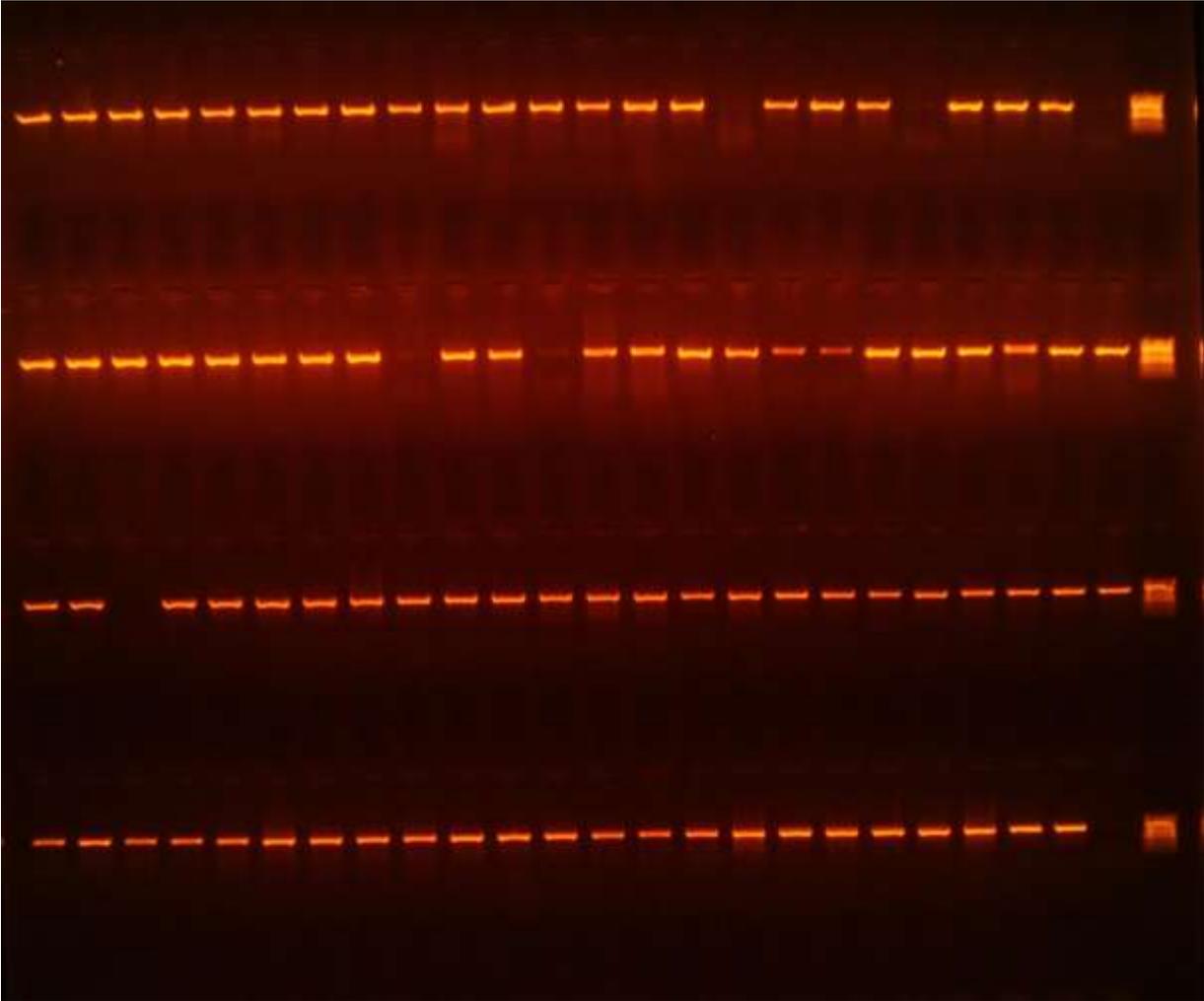
[HyperLadder™ 1kb Plus](#)

COI-trnT-rrnL 1031 bp



[HyperLadder™ 100bp - Bioline](#)

ITS 959 bp



[EasyLadder I - Bioline](#)

## Annexe 5

### >FhITS2-H2

ACCTGAAAATCTACTCTCACACAAGCGATACACGTGTGACCGTCATGTCATGCGATAAAAAATTTGCGGACGGCT  
ATGCCTGGCTCATTGAGGTCACAGCATATCCGAACACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATGGTAT  
GCTTGCGTCTCTCGGGGCGCTTGCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGACTGCCACGATTGGTAGTGCTAGGCTT  
AAAGAGGAGATTTGGGCTACGGCCCTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTACATTTACTGTTAAAGT  
GGTACTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGCACCCGGTCTTGTGGCTGGACTGCACGTACG  
TCGCCCCGGCGGTGCCTATCCCGGGTTGGACTGATAACCTGGTCTTTGACCATACGTACAACCTGAAACGGTGG  
ATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACCTGTGTGAATTAATGCAAACCTGCATACTGCTTTGAA  
CATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTTCGGCTTATAA  
ACTATCACGACGCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATCTCCTCTATGAGTAATCATGTG  
AGGTGCCAGATCTATGGCGTTTCCCTAATGTATCCGGATGCACCCTTGTCTTGGCAGAAAAGCCGTGGTGAGGT  
GCAGTGGCGGAATCGTGGTTTAAATAATCGGGTTGGTACTCAGTTGTCAGTGTGTTTGGCGATCCCCTAGTCGG  
CACACTTATGATTTCTGGGATAATTCATACCAGGCACGTCCGTCACCTGTCACCTTGTGATTGGTTTGATGCTG  
AACTTGGTCATGTGTCTGATGCTATTTTCATATAGCGACGGTACCCTTCGTGGTCTGTCTTCC

### >FhITS2-H3

ACCTGAAAATCTACTCTCACACAAGCGATACACGTGTGACCGTCATGTCATGCGATAAAAAATTTGCGGACGGCT  
ATGCCTGGCTCATTGAGGTCACAGCATATCCGAACACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATGGTAT  
GCTTGCGTCTCTCGGGGCGCTTGCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGACTGCCACGATTGGTAGTGCTAGGCTT  
AAAGAGGAGATTTGGGCTACGGCCCTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTACATTTACTGTTAAAGT  
GGTACTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGCACCCGGTCTTGTGGCTGGACTGCACGTACG  
TCGCCCCGGCGGTGCCTATCCCGGGTTGGACTGATAACCTGGTCTTTGACCATACGTACAACCTGAAACGGTGG  
ATCACTCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACCTGTGTGAATTAATGCAAACCTGCATACTGCTTTGAA  
CATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCATGGGTTAGCCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTTCGGCTTATAA  
ACTATCACGACGCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTTTTGCCAGCTGGCGTGATCTCCTCTATGAGTAATCATGTG  
AGGTGCCAGATCTATGGCGTTTCCCTAATGTATCCGGATGCACCCTTGTCTTGGCAGAAAAGCCGTGGTGAGGT  
GCAGTGGCGGAATCGTGGTTTAAATAATCGGGTTGGTACTCAGTTGTCAGTGTGTTTGGCGATCCCCTAGTCGG  
CACACTTATGATTTCTGGGATAATTCATACCAGGCACGTCCGTCACCTGTCACCTTGTGATTGGTTTGATGCTG  
AACTTGGTCATGTGTCTGAAGCTATTTTCATATAGCGACGGTACCCTTCGTGGTCTGTCTTCC

### >FhCOI-H1

GGGGTTATTAGTCATATTTGTGTGACTCTAACTAATAATGATTCTTTGTTTGGTTATTATGGTCTTATTTAGCTA  
TGGCTGCTATAGTATGTTTAGGTAGTGTGTTTGGGCTCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGGATGTGCATACT  
GCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACTATGGTTATTGGTATTCTACGGGTATTAAGGTCTTTTCTGGTTGATAATGT  
TGGGGGGGGTAGTTCTGTTTCGTATATGGGATCCTGTTGTGTGGTGAATTATAGGGTTTATTGTTTTATTACT  
ATTGGTGGGGTACTGGTATTATGCTTTCTGCTTCTTTTTGGATACTTTGCTTCATGATACATGGTTTGTGGT  
GCTCATTTTCATTAT

### >FhCOI-H2

GGGGTTATTAGTCATATTTGTGTGACTTTAACTAATAATGATTCTTTGTTTGGTTATTATGGTCTTATTTAGCTA  
TGGCTGCTATAGTATGTTTAGGTAGTGTGTTTGGGCTCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGGATGTGCATACT  
GCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACCATGGTATTGGTATTCTACGGGTATTAAGGTCTTTTCTGGTTGATAATGT

TGGGGGGGGGTAGTTCTGTTTCGTATATGGGATCCTGTTGTGTGGTGAATTATAGGGTTTATTGTTTTATTACT  
ATTGGTGGGGTACTGGTATTATGCTTTCTGCTTCTCTTTGGATACTTTGCTTCATGATACATGGTTTGTGGTT  
GCTCATTTTCATTAT

**>FhCOI-H3**

GGGGTTATTAGTCATATTTGTGTGACTCTAACTAATAATGATTCTTTGTTTGGTTATTATGGTCTTATTTAGCTA  
TGGCTGCTATAGTATGTTTAGGTAGTGTGTTTGGGCTCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGGATGTGCATACT  
GCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACTATGGTTATTGGTATTCTACAGGTATTAAGGTCTTTTCTGGTTGATAATGT  
TGGGGGGGGGTAGTTCTGTTTCGTATATGGGATCCTGTTGTGTGGTGAATTATAGGGTTTATTGTTTTATTACT  
ATTGGTGGGGTACTGGTATTATGCTTTCTGCTTCTCTTTGGATACTTTGCTTCATGATACATGGTTTGTGGTT  
GCTCATTTTCATTAT

**>FhCOI-H4**

GGGGTTATTAGTCATATTTGTGTGACTTTAACTAATAATGATTCTTTGTTTGGTTATTATGGTCTTATTTAGCTA  
TGGCTGCTATAGTATGTTTAGGTAGTGTGTTTGGGCGCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGGATGTGCATACT  
GCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACTATGGTTATTGGTATTCTACAGGTATTAAGGTCTTTTCTGGTTGATAATGT  
TGGGGGGGGGTAGTTCTGTTTCGTATATGGGATCCTGTTGTGTGGTGAATTATAGGGTTTATTGTTTTATTACT  
ATCGGTGGGGTACTGGTATTATGCTTTCTGCTTCTCTTTGGATACTTTGCTTCATGATACATGGTTTGTGGTT  
GCTCATTTTCATTAT

**>FhCOI-H5**

GGGGTTATTAGTCATATTTGTGTGACTCTAACTAATAATGATTCTTTGTTTGGTTATTATGGTCTTATTTAGCTA  
TGGCTGCTATAGTATGTTTAGGTAGTGTGTTTGGGCTCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGGATGTGCATACT  
GCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACTATGGTTATTGGTATTCTACAGGTATTAAGGTCTTTTCTGGTTGATAATGT  
TGGGGGGGGGTAGTTCTGTTTCGTATATGGGATCCTGTTGTGTGGTGAATTATAGGGTTTATTGTTTTATTACT  
ATTGGTGGGGTACTGGTATTATGCTTTCTGCTTCTCTTTGGATACTTTGCTTCATGATACATGGTTTGTGGTT  
GCTCATTTTCATTAT

**>FhCOI-H6**

GGGGTTATTAGTCATATTTGTGTGACTCTAACTAATAATGATTCTTTGTTTGGTTATTATGGTCTTATTTAGCTA  
TGGCTGCTATAGTATGTTTAGGTAGTGTGTTTGGGCTCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGGATGTGCATACT  
GCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACCATGGTTATTGGTATTCTACAGGTATTAAGGTCTTTTCTGGTTGATAATGT  
TGGGGGGGGGTAGTTCTGTTTCGTATATGGGATCCTGTTGTGTGGTGAATTATAGGGTTTATTGTTTTATTACT  
ATTGGTGGGGTACTGGTATTATGCTTTCTGCTTCTCTTTGGATACTTTGCTTCATGATACATGGTTTGTGGTT  
GCTCATTTTCATTAT

**>FhCOI-H7**

GGGGTTATTAGTCATATTTGTGTGACTTTGACTAATAATGATTCTTTGTTTGGTTATTATGGTCTTATTTAGCTA  
TGGCTGCTATAGTATGTTTAGGTAGTGTGTTTGGGCTCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGGATGTGCATACT  
GCTGTTTTTTTTAGTTCTGTTACTATGGTTATTGGTATTCTACAGGTATTAAGGTCTTTTCTGGTTGATAATGT  
TGGGGGGGGGTAGTTCTGTTTCGTATATGGGATCCTGTTGTGTGGTGAATTATAGGGTTTATTGTTTTATTACT  
ATTGGTGGGGTACTGGTATTATGCTTTCTGCTTCTCTTTGGATACTTTGCTTCATGATACATGGTTTGTGGTT  
GCTCATTTTCATTAT

**>FhNADI-H1**

TGTTGTTGAAAGCTTTTTATTTGGGTTTAAGTAGGTTTTTGCCTTTGTTATAAATTATGGTTTTTGTTCATTTTT  
ATACTTGGTGAGCGTAAGGTGTTGGGTTATATGCAGATTCGTAAGGGGCCTAATAAGGTTGGTTTGTGAGGTT  
TGTTGCAGAGGTTTTCGGATTAATGAAGTTAGTTATAAAGTTAAGTTTGTGTTTTTTCAGAATCGTAGTTGG  
TTGTCTTGGTGGGGTGTATTTGTTGGTTTTGTTGGCTTGTGGCTATTGTGTGTTGTTTTTTTTAGGTTTGGTG  
GTGTTAGTAGTGTTAAATTTATGTTGTGGTTTTAGTGGTTACTAGTATGACTGGTTATAGGTTGTTAAGTGTTG  
GTTGGGGTTGTTATAAATAAGTTTGCCTTTGGTTAGCTGTGTTCGTTCTGCTTTTGGGTCTGTTAGGTTTGAAGGCTT  
GTTTTATGTGATTGTTGTTTTGGTTGCATTGGTTTGGGGGAGTTATGGTGTTCCTGTTTGTGGTGAATTTG  
GTGGTATGTG

**>FhNADI-H2**

TGTTGTTGAAAGCTTTTTATTTGGGTTTAAGTAGGTTTTTGCCTTTGTTATAAATTATGGTTTTTGTTCATTTTT  
ATACTTGGTGAGCGTAAGGTGTTGGGTTATATGCAGATTCGTAAGGGGCCTAATAAGGTTGGTTTGTGAGGTT  
TGTTGCAGAGGTTTTCGGATTAATGAAGTTAGTTATAAAGTTAAGTTTGTGTTTTTTCAGAATCGTAGTTGG  
TTGTCTTGGTGGGGTGTATTTGTTGGTTTTGTTGGCTTGTGGCTATTGTGTGTTGTTTTTTTTAGGTTCCGGTG  
GTGTTAGTAGTGTTAAATTTATGTTGTGGTTTTAGTGGTTACTAGTATGACTGGTTATAGGTTGTTAAGTGTTG  
GTTGGGGTTGTTATAAATAAGTTTGCCTTTGGTTAGCTGTGTTCGTTCTGCTTTTGGGTCTGTTAGGTTTGAAGGCTT  
GTTTTATGTGATTGTTGTTTTGGTTGCATTGGTTTGGGGGAGTTATGGTGTTCCTGTTTGTGGTGAATTTG  
GTGGTATGTG

**>FhNADI-H3**

TGTTGTTGAAAGCTTTTTATTTGGGTTTGAGTAGGTTTTTGCCTTTGTTATAAATTATGGTTTTTGTTCATTTTT  
ATACTTGGTGAGCGTAAGGTGTTGGGTTATATGCAGATTCGTAAGGGGCCTAATAAGGTTGGTTTGTGAGGTT  
TGTTGCAGAGGTTTTCGGATTAATGAAGTTAGTTATAAAGTTAAGTTTGTGTTTTTTCAGAATCGTAGTTGG  
TTGTCTTGGTGGGGTGTATTTGTTGGTTTTGTTGGCTTGTGGCTATTGTGTGTTGTTTTTTTTAGGTTTGGTG  
GTGTTAGTAGTGTTAAATTTATGTTGTGGTTTTAGTGGTTACTAGTATGACTGGTTATAGGTTGTTAAGTGTTG  
GTTGGGGTTGTTATAAATAAGTTTGCCTTTGGTTAGCTGTGTTCGTTCTGCTTTTGGGTCTGTTAGGTTTGAAGGCTT  
GTTTTATGTGATTGTTGTTTTGGTTGCATTGGTTTGGGGGAGTTATGGTGTTCCTGTTTGTGGTGAATTTG  
GTGGTATGTG

**>FhNADI-H4**

TGTTGTTGAAAGCTTTTTATTTGGGTTTAAGTAGGTTTTTGCCTTTGTTATAAATTATGGTTTTTGTTCATTTTT  
ATACTTGGTGAGCGTAAGGTGTTGGGTTATATGCAGATTCGTAAGGGGCCTAATAAGGTTGGTTTGTGAGGTT  
TGTTGCAAAGGTTTTCGGATTAATGAAGTTAGTTATAAAGTTAAGTTTGTGTTTTTTCAGAATCGTAGTTGGT  
TGCTTGGTGGGGTGTATTTGTTGGTTTTGTTGGCTTGTGGCTATTGTGTGTTGTTTTTTTTAGGTTTGGTG  
GTGTTAGTAGTGTTAAATTTATGTTGTGGTTTTAGTGGTTACTAGTATGACTGGTTATAGGTTGTTAAGTGTTG  
GTTGGGGTTGTTATAAATAAGTTTGCCTTTGGTTAGCTGTGTTCGTTCTGCTTTTGGGTCTGTTAGGTTTGAAGGCTT  
GTTTTATGTGATTGTTGTTTTGGTTGCATTGGTTTGGGGGAGTTATGGTGTTCCTGTTTGTGGTGAATTTG  
GTGGTATGTG

**>FhNADI-H5**

TGTTGTTGAAAGCTTTTTATTTGGGTTTAAAGTAGGTTTTTGCCTTTGTTATAAATTATGGTTTTTGTTCATTTTT  
ATACTTGGTGAGCGTAAGGTGTTGGGTTATATGCAGATTCGTAAGGGGCCTAATAAGGTTGGTTTGTGAGGTT  
TGTTGCAGAGTTTTGCGGATTAATGAAGTTAGTTATAAAGTTAAGTTTGTGTTTTTTCAGAATCGTAGTTGG  
TTGTCTTGGTGGGGTATTTATTTGTTGGTTTTGTTGGCTTGTGGCTATTGTGTGTTGTTTTTTTTAGGTTTGGTG  
GTGTTAGTAGTGTTAAATTTATGTTGTGGTTTTTGTGGTTACTAGTATGACTGGTTATAGGTTGTTAAGTGTTG  
GTTGGGGTTGTTATAAATAAGTTTGTCTTTGGTTAGCTGTGTTCTGTTCTGTTTTGGGCTGTTAGGTTTGAAGGCTT  
GTTTTATGTGATTGTTGTTTTGGTTGCATTGTTTTGGGGGAGTTATGGTGTCTTGTGTTTGGTGAATTTG  
GTGGTATGTG

**>FhCOI-trnT-rrnL-H1**

GGGGTTAGTTTAGGTATTTTTAGAATTCTGCTTTTGTAAAGCAGAGGTGGTTTTTGGCTGCTCTCTATGTTTTAT  
TGGCTGTGAGGTTGATTTTATTTGGGTTTCGTTTTTGTAGATTACCTTTTGCATCATGATTTGTTGATTTTTGGTTT  
GGATTGATTGTTCCGAAGAGTACTGATTTTTGTTTTGCTTGCTTAGGGTTGTTTTGGAGGTGAGTAACTTTTTG  
TAGAGCTTAATTGAGGTTGTGATAGGTGATTCGGAGTACTTGATATCTGATTTTGTAGTAGATTTTGTGGTATA  
TTGCGGCTTAGTTATGATATTAGGTCGTTGGTAAGATCAGGATTTTGTGCTTTTTGTAATAGGGATTAGAATTC  
TCCTGATTTTAGGTGTGTGTTATTATTC---  
GTTTGTGGCTCTGTCTGGGATTTATATGAATCTACTCTTAGCTAATTGGGTTTGATAATGATAGAATAAGTAGG  
TGTTTTGATTAGCTTTATTTTTCTTGGTCTTCTCGGTCTGTTTATTAATAAACATTTCTATTCGGATTTATGAATA  
GTAGTGCCTGCCAGTGCTTTGTAATGGCCGCAGTATTTTACTGTGCTAAGGTAGCATAATTAGTTGCCTCA  
TAATTGGAGGATTGTTTGAAGGTTTACTTGAGGATTTGACTAGATTAGGGCTTGGGCTGAAATTGGAGTTG  
AGGTGCAGATCCCTCGGATTTTAATAAGACGGAAAGACCCCGAGATCTTATATTGTGTTATTTGTTGGGGT  
AAAATGCTATGTTTTATGTTATTTTGTATCCTAATGGATAAAAGTTTAAAGTTACCTCGGGGATAACTAGGTAA  
AAAATAAGGAGAGGTCGGATCGATTTATTTTATTGCTATCTCGATGTTGACTTGGGGAAAAGTAGAGGGGTGT  
AGGAGTTTCTTTACTGGGTCTGTTTCGACCGTAGTT

**>FhCOI-trnT-rrnL-H2**

GGGGTTAGTTTAGGTATTTTTAGAATTCTGCTTTTGTAAAGCAGAGGTGGTTTTTGGCTGCTCTCTATGTTTTAT  
TGGCTGTGAGGTTGATTTTATTTGGGTTTCGTTTTTGTAGATTACCTTTTGCATCATGATTTGTTGATTTTTGGTTT  
GGATTGATTGTTCCGAAGAGTACTGATTTTTGTTTTGCTTGCTTAGGGTTGTTTTGGAGGTGAGTAACTTTTTG  
TAGAGCTTAATTGAGGTTGTGATAGGTGATTCGGAGTACTTGATATCTGATTTTGTAGTAGATTTTGTGGCATA  
TTGCGGCTTAGTTATGATATTAGGTCGTTGGTAAGATCAGGATTTTGTGCTTTTTGTAATAGGGATTAAAATTCT  
CCTGATTTTAGGTGTGTGTTATTATTC---  
GTTTGTGGCTCTGTCTAGGATTTATATGAATCTACTCTTAGCTAATAGGGTTTGATAATGATAGAATAAGTAGG  
TGTTTTGATTAGCTTTATTTTTCTTGGTCTTCTCGGTCTGTTTATTAATAAACATTTCTATTCGGATTTATGAATA  
GTAGTGCCTGCCAGTGCTTTGTAATGGCCGCAGTATTTTACTGTGCTAAGGTAGCATAATTAGTTGCCTCA  
TAATTGGAGGATTGTTTGAAGGTTTACTTGAGGATTTGACTAGATTAGGGCTTGGGCTGAAATTGGAGTTG  
AGGTGCAGATCCCTCGGATTTTAATAAGACGGAAAGACCCCGAGATCTTATATTGTGTTATTTGTTGGGGT  
AAAATGCTATGTTTTATGTTATTTTGTATCCTAATGGATAAAAGTTTAAAGTTACCTCGGGGATAACTAGGTAA  
AAAATAAGGAGAGGTCGGATCGATTTATTTTATTGCTATCTCGATGTTGACTTGGGGAAAAGTAGAGGGGTGT  
AGGAGTTTCTTTACTGGGTCTGTTTCGACCGTAGTT

**>FhCOI-trnT-rrnL-H3**

GGGGTTAGTTTAGGTATTTTTAGAATTCTGCTTTTGTAAGCAGAGGTGGTTTTGGCTGCTCTCTATGTTTTAT  
TGGCTGTGAGGTTGATTTATTTGGGTTTCGTTTTTAGATTACCTTTGCATCATGATTTGTTGATTTTTGGTTT  
GGATTGATTGTTCCGAAGAGTACTGATTTTTGTTTTGCTTGCTTAGGGTTGTTTTGGAGGTGAGTAACTTTTTG  
TAGAGCTTAATTGAGGTTGTGATAGGTGATTCGGAGTACTTGATATCTGATTTTGAGTAGATTTTGTTGGTATA  
TTGCGGCTTAGTTATGATATTAGGTCGTTGGTAAGATCAGGATTTTGCTTTTTGTAATAGGGATTAGAATTC  
TCCTGATTTTAGGTGTGTGTTATTTTTC---

GTTTGTGGCTCTGTCTGGGATTTATATGAATCTACTCTTAGCTAATTGGGTTTGATAATGATAGAATAAGTAGG  
TGTTTTGATTAGCTTTATTTTTCTTGGTCTTCCTCGGTCTGTTTATTAACATTTCTATTTCGGATTTATGAATA  
GTAGTGCCTGCCAGTGCTTTGTAATGGCCGAGTATTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATTAGTTGCCTCA  
TAATTGGAGGATTGTTGAAAGGTTGACTTGAGGATTTGACTAGATTAGGGCTTGGGCTGAAATTGGAGTTG  
AGGTGCAGATCCCTCGGATTTAATAAGACGGAAAGACCCCGAGATCTTATATTGTGTTATTTGTTGGGGT  
AAAATGCTATGTTTTATGTTATTTTGATCCTAATGGATAAAAGGTTAAGTTACCTCGGGGATAACTAGGTAA  
AAAATAAGGAGAGGTCGGATCGATTTATTTATTGCTATCTCGATGTTGACTTGGGGAAAAGTAAAGGGGTGT  
AGGAGTTTCTTACTGGGTCTGTTGACCGTAGTT

**>FhCOI-trnT-rrnL-H4**

GGGGTTAGTTTAGGTATTTTTAGAATTCTGCTTTTGTAAGCAGAGGTGGTTTTGGCTGCTCTCTATGTTTTAT  
TGGCTGTGAGGTTGATTTATTTGGGTTTCGTTTTTAGATTACCTTTGCATCATGATTTGTTGATTTTTGGTTT  
GGATTGATTGTTCCGAAGAGTACTGATTTTTGTTTTGCTTGCTTAGGGTTGTTTTGGAGGTGAGTAACTTTTTG  
TAGAGCTTAATTGAGGTTGTGATAGGTGATTCGGAGTACTTGATATCTGATTTTGAGTAGATTTTGTTGGTATA  
TTGCGGCTTAGTTATGATATTAGGTCGTTGGTAAGATCAGGATTTTGCTTTTTGTAATAGGGATTAGAATTC  
TCCTGATTTTAGGTGTGTGTTATTATTC---

GTTTGTGGCTCTGTCTAGGATTTATATGAATCTACTCTTAGCTAATTGGGTTTGATAATGATAGAATAAGTAGG  
TGTTTTGATTAGCTTTATTTTTCTTGGTCTTCCTCGGTCTGTTTATTAACATTTCTATTTCGGATTTATGAATA  
GTAGTGCCTGCCAGTGCTTTGTAATGGCCGAGTATTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATTAGTTGCCTCA  
TAATTGGAGGATTGTTGAAAGGTTGACTTGAGGATTTGACTAGATTAGGGCTTGGGCTGAAATTGGAGTTG  
AGGTGCAGATCCCTCGGATTTAATAAGACGGAAAGACCCCGAGATCTTATATTGTGTTATTTGTTGGGGT  
AAAATGCTATGTTTTATGTTATTTTGATCCTAATGGATAAAAGGTTAAGTTACCTCGGGGATAACTAGGTAA  
AAAATAAGGAGAGGTCGGATCGATTTATTTATTGCTATCTCGATGTTGACTTGGGGAAAAGTAGAGGGGTGT  
AGGAGTTTCTTACTGGGTCTGTTGACCGTAGTT

**>FhCOI-trnT-rrnL-H5**

GGGGTTAGTTTAGGTATTTTTAGAATTCTGCTTTTGTAAGCAGAGGTGGTTTTGGCTGCTCTCTATGTTTTAT  
TGGCTGTGAGGTTGATTTATTTGGGTTTCGTTTTTAGATTACCTTTGCATCATGATTTGTTGATTTTTGGTTT  
GGATTGATTTTTCCGAAGAGTACTGATTTTTGTTTTGCTTGCTTAGGGTTGTTTTGGAGGTGAGTAACTTTTTG  
TAGAGCTTAATTGAGGTTGTGATAGGTGATTCGGAGTACTTGATATCTGATTTTGAGTAGATTTTGTTGGTATA  
TTGCGGCTTAGTTATGATATTAGGTCGTTGGTAAGATCAGGATTTTGCTTTTTGTAATAGGGATTAGAATTC  
TCCTGATTTTAGGTGTGTGTTATTATTC---

GTTTGTGGCTCTGTCTAGGATTTATATGAATCTACTCTTAGCTAATTGGGTTTGATAATGATAGAATAAGTAGG  
TGTTTTGATTAGCTTTATTTTTCTTGGTCTTCCTCGGTCTGTTTATTAACATTTCTATTTCGGATTTATGAATA  
GTAGTGCCTGCCAGTGCTTTGTAATGGCCGAGTATTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATTAGTTGCCTCA  
TAATTGGAGGATTGTTGAAAGGTTGACTTGAGGATTTGACTAGATTAGGGCTTGGGCTGAAATTGGAGTTG  
AGGTGCAGATCCCTCGGATTTAATAAGACGGAAAGACCCCGAGATCTTATATTGTGTTATTTGTTGGGGT  
AAAATGCTATGTTTTATGTTATTTTGATCCTAATGGATAAAAGGTTAAGTTACCTCGGGGATAACTAGGTAA  
AAAATAAGGAGAGGTCGGATCGATTTATTTATTGCTATCTCGATGTTGACTTGGGGAAAAGTAGAGGGGTGT  
AGGAGTTTCTTACTGGGTCTGTTGACCGTAGTT

**>FhCOI-trnT-rrnL-H6**

GGGGTTAGTTTAGGTATTTTTAGAATTCTGCTTTTGTAAAGCAGAGGTGGTTTTTGGCTGCTCTCTATGTTTTAT  
TGGCTGTGAGGTTGATTTTATTTGGGTTTCGTTTTTATAGATTACCTTTTGCATCATGATTTGTTGATTTTTGGTTT  
GGATTGATTGTTCCGAAGAGTACTGATTTTTGTTTTGCTTGCTTAGGGTTGTTTTGGAGGTGAGTAACTTTTTG  
TAGAGCTTAATTGAGGTTGTGATAGGTGATTCGGAGTACTTGATATCTGATTTTGGAGTAGATTTTGTGGTATA  
TTGCGGCTTAGTTATGATATTAGGTCGTTGGTAAGATCAGGATTTTGTGCTTTTTGTAATAGGGATTAATAATTCT  
CCTGATTTTAGGTGTGTGTTATTATTC---

GTTTGTGGCTCTGTCTGGGATTTATATGAATCTACTCTTAGCTAATTGGGTTTGATAATGATAGAATAAGTAGG  
TGTTTTGATTAGCTTTATTTTTCTTGGTCTTCCTCGGTCTGTTTATTAATAAACATTTCTATTTCGGATTTATGAATA  
GTAGTGCCTGCCAGTGCTTTGTAAATGGCCGCAGTATTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATTAGTTGCCTCA  
TAATTGGAGGATTGTTTGAAGGTTTACTTGAGGATTTGACTAGATTAGGGCTTGGGCTGAAATTGGAGTTG  
AGGTGCAGATCCCTCGGATTTTAATAAGACGGAAAGACCCCGAGATCTTATATTGTGTTATTTGTTTGGGGT  
AAAATGCTATGTTTTATGTTATTTTATGATCCTAATGGATAAAAGGTTTAAAGTTACCTCGGGGATAACTAGGTAA  
AAAATAAGGAGAGGTCGGATCGATTTATTTTATTGCTATCTCGATGTTGACTTGGGGAAAAGTAGAGGGGTGT  
AGGAGTTTCTTTACTGGGTCTGTTTCGACCGTAGTT

**>FhCOI-trnT-rrnL-H7**

GGGGTTAGTTTAGGTATTTTTAGAATTCTGCTTTTGTAAAGCAGAGGTGGTTTTTGGCTGCTCTCTATGTTTTAT  
GGGCTGTGAGGTTGATTTTATTTGGGTTTCGTTTTTATAGATTACCTTTTGCATCATGATTTGTTGATTTTTGGTTT  
GGATTGATTGTTCCGAAGAGTACTGATTTTTGTTTTGCTTGCTTAGGGTTGTTTTGGAGGTGAGTAACTTTTTG  
TAGAGCTTAATTGAGGTTGTGATAGGTGATTCGGAGTACTTGATATCTGATTTTGGAGTAGATTTTGTGGTATA  
TTGCGGCTTAGTTATGATATTAGGTCGTTGGTAAGATCAGGATTTTGTGCTTTTTGTAATAGGGATTAATAATTCT  
CCTGATTTTAGGTGTGTGTTATTATTC---

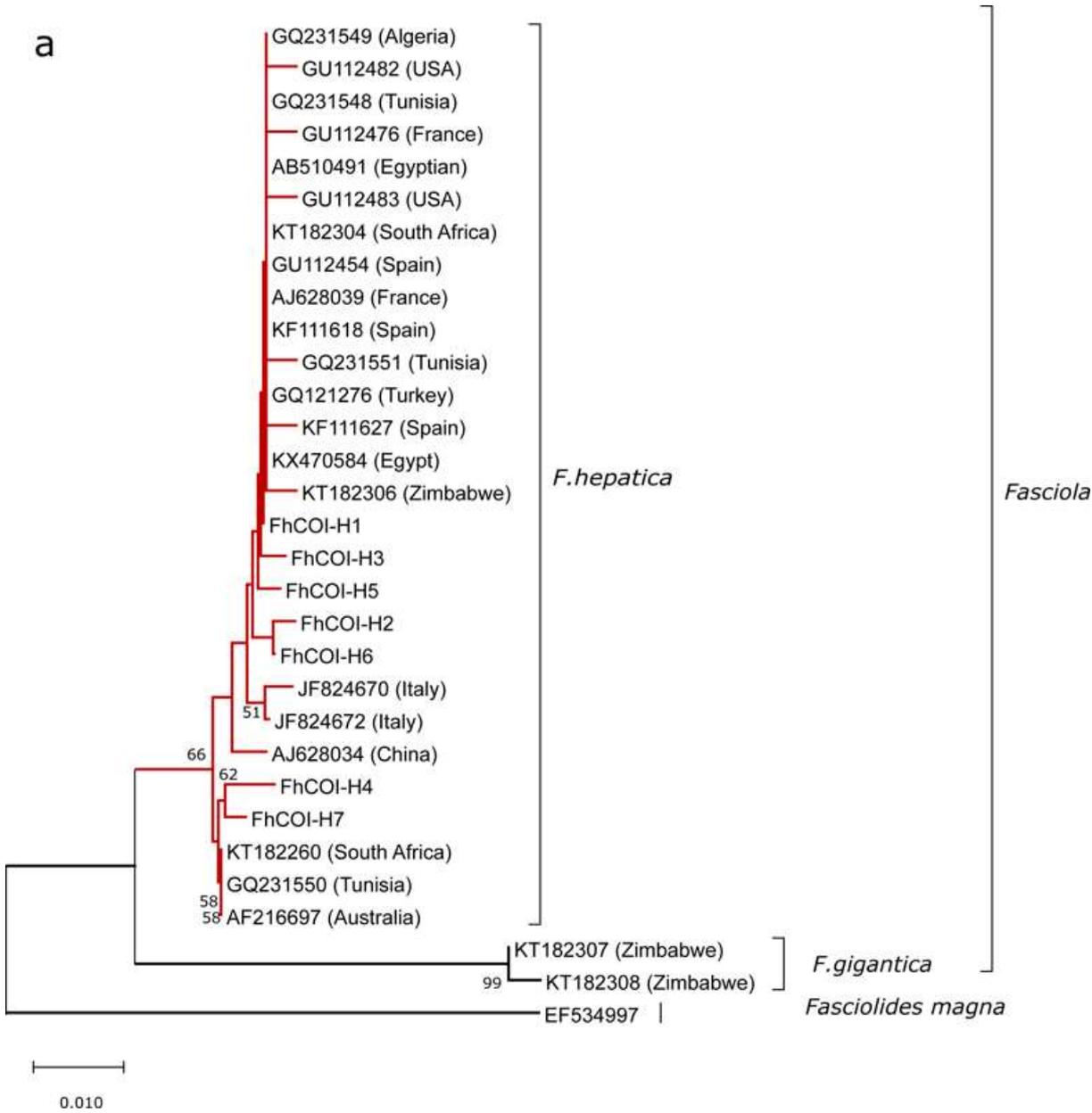
GTTTGTGGCTCTGTCTGGGATTTATATGAATCTACTCTTAGCTAATTGGGTTTGATAATGATAGAATAAGTAGG  
TGTTTTGATTAGCTTTATTTTTCTTGGTCTTCCTCGGTCTGTTTATTAATAAACATTTCTATTTCGGATTTATGAATA  
GTAGTGCCTGCCAGTGCTTTGTAAATGGCCGCAGTATTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATTAGTTGCCTCA  
TAATTGGAGGATTGTTTGAAGGTTTACTTGAGGATTTGACTAGATTAGGGCTTGGGCTGAAATTGGAGTTG  
AGGTGCAGATCCCTCGGATTTTAATAAGACGGAAAGACCCCGAGATCTTATATTGTGTTATTTGTTTGGGGT  
AAAATGCTATGTTTTATGTTATTTTATGATCCTAATGGATAAAAGGTTTAAAGTTACCTCGGGGATAACTAGGTAA  
AAAATAAGGAGAGGTCGGATCGATTTATTTTATTGCTATCTCGATGTTGACTTGGGGAAAAGTAGAGGGGTGT  
AGGAGTTTCTTTACTGGGTCTGTTTCGACCGTAGTT

**>FhCOI-trnT-rrnL-H8**

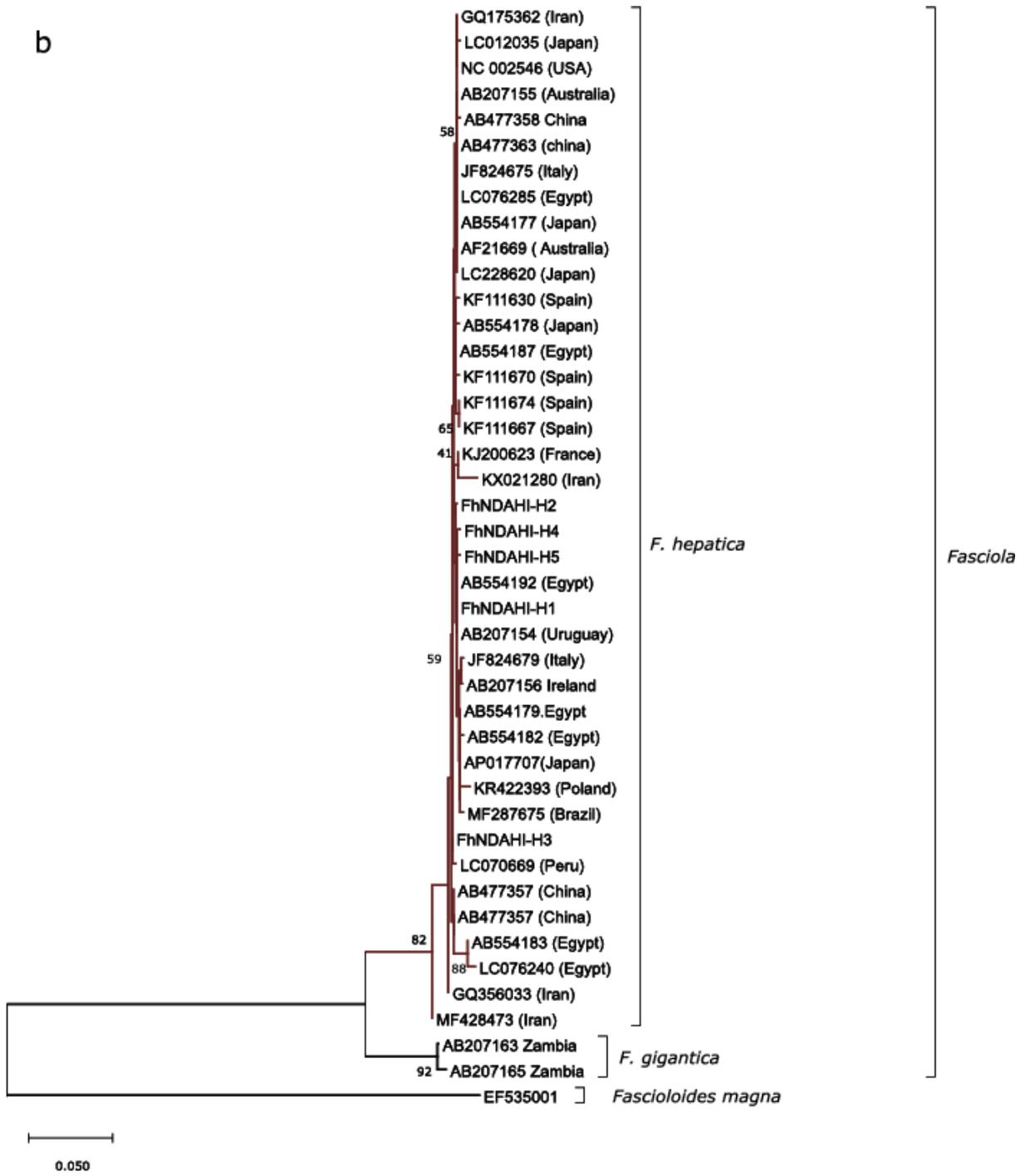
GGGGTTAGTTTAGGTATTTTTAGAATTCTGCTTTTGTAAAGCAGAGGTGGTTTTTGGCTGCTCTCTATGTTTTAT  
TGGCTGTGAGGTTGATTTTATTTGGGTTTCGTTTTTATAGATTACCTTTTGCATCATGATTTGTTGATTTTTGGTTT  
GGATTGATTGTTCCGAAGAGTACTGATTTTTGTTTTGCTTGCTTAGGGTTGTTTTGGAGGTGAGTAACTTTTTG  
TAGAGCTTAATTGAGGTTGTGATAGGTGATTCGGAGTACTTGATATCTGATTTTGGAGTAGATTTTGTGGCATA  
TTGCGGCTTAGTTATGATATTAGGTCGTTGGTAAGATCAGGATTTTGTGCTTTTTGTAATAGGGATTAATAATTCT  
CCTGATTTTAGGTGTGTGTTATTATTC---

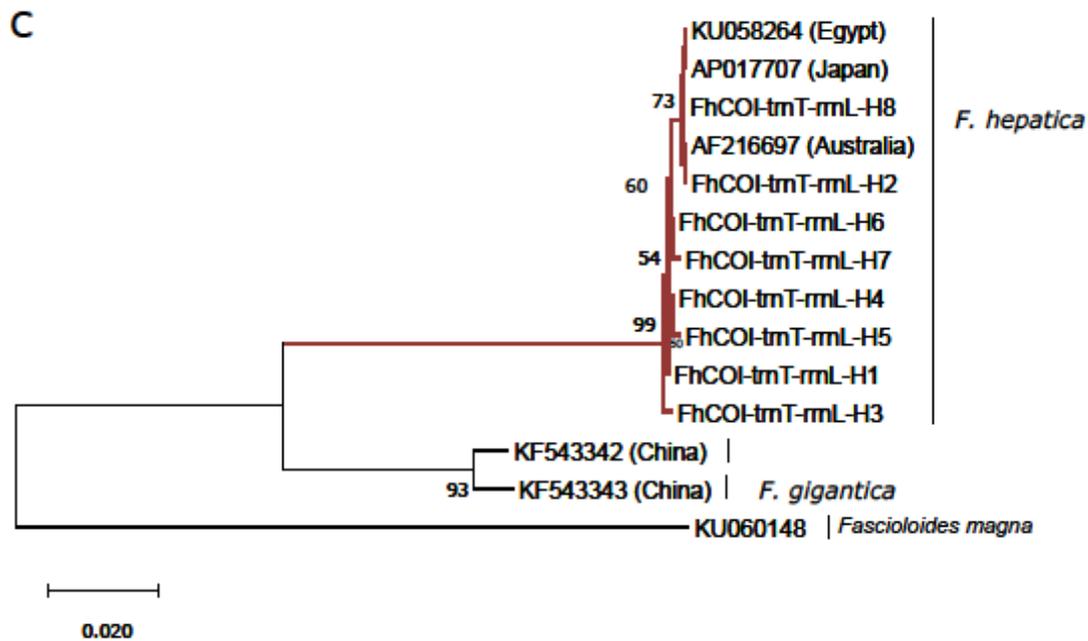
GTTTGTGGCTCTGTCTGGGATTTATATGAATCTACTCTTAGCTAATAGGGTTTGATAATGATAGAATAAGTAGG  
TGTTTTGATTAGCTTTATTTTTCTTGGTCTTCCTCGGTCTGTTTATTAATAAACATTTCTATTTCGGATTTATGAATA  
GTAGTGCCTGCCAGTGCTTTGTAAATGGCCGCAGTATTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATTAGTTGCCTCA  
TAATTGGAGGATTGTTTGAAGGTTTACTTGAGGATTTGACTAGATTAGGGCTTGGGCTGAAATTGGAGTTG  
AGGTGCAGATCCCTCGGATTTTAATAAGACGGAAAGACCCCGAGATCTTATATTGTGTTATTTGTTTGGGGT  
AAAATGCTATGTTTTATGTTATTTTATGATCCTAATGGATAAAAGGTTTAAAGTTACCTCGGGGATAACTAGGTAA  
AAAATAAGGAGAGGTCGGATCGATTTATTTTATTGCTATCTCGATGTTGACTTGGGGAAAAGTAGAGGGGTGT  
AGGAGTTTCTTTACTGGGTCTGTTTCGACCGTAGTT

# Annexe 6



b





Arbres de consensus construits avec la méthode NJ montrant les relations phylogénétiques entre *F. hepatica* et *F. gigantica*. Phylogénie déduite des séquences COI (a) NADI (b) et COI-trnT-rrnL (c). Les nombres affichés aux nœuds des branches sont des valeurs bootstrap. *Fascioloides magna* (COI, NADI et COI-trnT-rrnL) a été utilisé comme groupe externe.

## Annexe 7

**Tableau 1** : La distribution des cinq niveaux d'anticorps à *Fasciola hepatica* détectés chez les bovins selon les quatre saisons de l'année au Nord de l'Algérie

Niveau d'anticorps		Saison				Total
		Automne	Hiver	Printemps	été	
0	N0	72	73	70	64	279
	% of row	25.806	26.165	25.090	22.939	100.000
	% of column	35.821	52.518	37.037	43.836	41.333
+/-	N0	4	1	4	3	12
	% of row	33.333	8.333	33.333	25.000	100.000
	% of column	1.990	0.719	2.116	2.055	1.778
+	N0	21	25	19	18	83
	% of row	25.301	30.120	22.892	21.687	100.000
	% of column	10.448	17.986	10.053	12.329	12.296
++	N0	40	17	37	17	111
	% of row	36.036	15.315	33.333	15.315	100.000
	% of column	19.900	12.230	19.577	11.644	16.444
+++	N0	64	23	59	44	190
	% of row	33.684	12.105	31.053	23.158	100.000
	% of column	31.841	16.547	31.217	30.137	28.148
total	N0	<b>201</b>	<b>139</b>	<b>189</b>	<b>146</b>	<b>675</b>
	% of row	<b>29.778</b>	<b>20.593</b>	<b>28.000</b>	<b>21.630</b>	<b>100.000</b>
	% of column	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>

**Tableau 2:** La distribution des cinq niveaux d'anticorps à *Fasciola hepatica* selon les différentes classes d'âge des bovins abattus au Nord de l'Algérie

Niveau d'anticorps		Age			
		Agé	Intermédiaire	Jeune	total
0	NO	58	94	127	279
	% of row	20.789	33.692	45.520	100.000
	% of column	31.183	32.082	64.796	41.333
+/-	NO	2	7	3	12
	% of row	16.667	58.333	25.000	100.000
	% of column	1.075	2.389	1.531	1.778
+	NO	13	45	25	13
	% of row	15.663	54.217	30.120	100.000
	% of column	6.989	15.358	12.755	12.296
++	NO	31	50	30	111
	% of row	27.928	45.045	27.027	100.000
	% of column	16.667	17.065	15.306	16.444
+++	NO	82	97	11	190
	% of row	43.158	51.053	5.789	100.000
	% of column	44.086	33.106	5.612	28.148
total	NO	<b>186</b>	<b>293</b>	<b>196</b>	<b>675</b>
	% of row	<b>27.556</b>	<b>43.407</b>	<b>29.037</b>	<b>100.000</b>
	% of column	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>

**Tableau 3:** La distribution des cinq niveaux d'anticorps à *Fasciola hepatica* selon le sexe des bovins abattus au Nord de l'Algérie

Niveau d'anticorps		Sexe		
		Femelle	Mâle	total
0	NO	78	201	279
	% of row	27.957	72.043	100.000
	% of column	27.465	51.407	41.333
+/-	NO	5	7	12
	% of row	41.667	58.333	100.000
	% ofcolumn	1.761	1.790	1.778
+	NO	24	59	83
	% of row	28.916	71.084	100.000
	% ofcolumn	8.451	15.090	12.296
++	NO	49	62	111
	% of row	44.144	55.856	100.000
	% ofcolumn	17.254	15.857	16.444
+++	NO	128	62	190
	% of row	67.368	32.632	100.000
	% ofcolumn	45.070	15.857	28.148
total	NO	<b>284</b>	<b>391</b>	<b>675</b>
	% of row	<b>42.074</b>	<b>57.926</b>	<b>100.000</b>
	% ofcolumn	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>

**Tableau 4** : la distribution des cinq niveaux d'anticorps à *Fasciola hepatica* selon la localité d'origine des bovins abattus au Nord de l'Algérie

Niveau d'anticorps		Localités			
		Bejaia	Bouira	Tizi-Ouzou	total
0	NO	90	82	107	279
	% of row	32.258	29.391	38.351	100.000
	% of column	42.857	37.788	43.145	41.333
+/-	NO	4	6	2	12
	% of row	33.333	50.000	16.667	100.000
	% of column	1.905	2.765	0.806	1.778
+	NO	21	17	45	83
	% of row	25.301	20.482	54.217	100.000
	% of column	10.000	7.834	18.145	12.296
++	NO	40	30	41	111
	% of row	36.036	27.027	36.937	100.000
	% of column	19.048	13.825	16.532	16.444
+++	NO	55	82	53	190
	% of row	28.947	43.158	27.895	100.000
	% of column	26.190	37.788	21.371	28.148
total	NO	<b>210.000</b>	<b>217.000</b>	<b>248.000</b>	675
	% of row	<b>31.111</b>	<b>32.148</b>	<b>36.741</b>	<b>100.000</b>
	% of column	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>

**Tableau 5:** la distribution des cinq niveaux d'anticorps à *Fasciola hepatica* selon les différentes races des bovins abattus au Nord de l'Algérie

Niveau d'anticorps		Race					
		Croisé	Fleckvieh	Holstein	Montbeliard	charolais	total
0	NO	70	33	78	66	32	279
	% of row	25.090	11.828	27.957	23.656	11.470	100.000
	% of column	42.169	37.079	41.711	32.836	100.000	41.333
+/-	NO	4	2	4	2	0	12
	% of row	33.333	16.667	33.333	16.667	0.000	100.000
	% of column	2.410	2.247	2.139	0.995	0.000	1.778
+	NO	18	10	38	17	0	83
	% of row	21.687	12.048	45.783	20.482	0.000	100.000
	% of column	10.843	11.236	20.321	8.458	0.000	12.296
++	NO	33	13	26	39	0	111
	% of row	29.730	11.712	23.423	35.135	0.000	100.000
	% of column	19.880	14.607	13.904	19.403	0.000	16.444
+++	NO	41	31	41	77	0	190
	% of row	21.579	16.316	21.579	40.526	0.000	100.000
	% of column	24.699	34.831	21.925	38.308	0.000	28.148
total	NO	<b>166.000</b>	<b>89.000</b>	<b>187.000</b>	<b>201.000</b>	<b>32.000</b>	675
	% of row	<b>24.593</b>	<b>13.185</b>	<b>27.704</b>	<b>29.778</b>	<b>4.741</b>	<b>100.000</b>
	% of column	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>