



HAL
open science

Caractérisation des Anisakidae dans les poissons marins : développement d'une méthode d'identification par séquençage à haut-débit et étude de prévalence

Yuwalee Seesao

► To cite this version:

Yuwalee Seesao. Caractérisation des Anisakidae dans les poissons marins : développement d'une méthode d'identification par séquençage à haut-débit et étude de prévalence. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S043 . tel-01412878

HAL Id: tel-01412878

<https://theses.hal.science/tel-01412878v1>

Submitted on 9 Dec 2016

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

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



Université Lille 2 Droit et Santé

Ecole doctorale Biologie - Santé

Thèse de Doctorat en parasitologie

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur ès sciences de l'Université Lille 2

Caractérisation des Anisakidae dans les poissons marins :
développement d'une méthode d'identification par séquençage
à haut-débit et étude de prévalence

Par
Yuwalee SEESAO

Dirigée par Dr. Eric Viscogliosi

Soutenue publiquement le 08 Décembre 2015

Devant un jury composé de :

Pr. Jean Dupouy-Camet	Professeur, Université Paris Descartes - Hôpital Cochin, Paris	Rapporteur
Dr. Hicham El Alaoui	Maître de conférences, Université Auvergne, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Pr. Jean-Lou Justine	Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris	Examineur
Dr. Patrick Fach	Directeur de Recherche, Anses, Maisons Alfort	Examineur
Dr. Eric Viscogliosi	Directeur de Recherche, CNRS, CIIL – BDPEE, Lille	Directeur de thèse
Dr. Cécile-Marie Aliouat-Denis	Maître de conférences, Université Lille 2 – CIIL, Lille	Co-directrice de thèse
Dr. Mélanie Gay	Chargée de Recherche, Anses, Boulogne-Sur-Mer	Co-encadrante de thèse
M. Christophe Audebert	Chargé de Recherche, Gènes Diffusion, Lille	Co-encadrant de thèse
Dr. Véronique Verrez-Bagnis	Chargée de Recherche, Ifremer, Nantes	Membre invité

Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé d'octobre 2012 à septembre 2015. Celle-ci a été financée par le Ministère des Sciences et Technologies de Thaïlande. Les laboratoires d'accueil ont participé également au financement de certaines formations ainsi qu'à la participation aux différents congrès. Ce travail a été accompli dans le cadre du programme *Fish-Parasites* de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-ALIA-004, partenariats : Annexe 10). Pour répondre aux objectifs de la thèse, les différentes tâches ont été réparties dans trois laboratoires différents situés à Boulogne-sur-Mer et Lille. Les trois laboratoires ainsi que leurs expertises étaient les suivants :

L'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) a été le premier laboratoire d'accueil. Une partie du travail a été réalisée au sein de l'Unité Bactériologie et Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Laboratoire de Sécurité des Aliments - Site de Boulogne sur Mer sous la direction de Monsieur Pierre Malle dans un premier temps, puis de Madame Anne BRISABOIS depuis 1^{er} septembre 2012. La thèse était placée sous le co-encadrement du Dr. Mélanie GAY.

L'Equipe BDPEE (Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents, INSERM U 1019 – CNRS, UMR 8204) basée à l'Institut Pasteur de Lille (IPL) et appartenant au Centre d'Immunité et d'Infection de Lille (CIIL). Cette équipe, coordinatrice de l'action *Fish-Parasites*, a apporté son expertise dans l'identification moléculaire de *Cryptosporidium* et *Blastocystis*. La thèse a tout été d'abord été sous la direction du Dr. Eduardo DEI-CAS puis du Dr. Eric VISCOGLIOSI en co-direction avec le Dr. Cécile-Marie ALIOUAT.

Gènes Diffusion, société de biotechnologie experte dans la sélection d'animaux d'élevage collabore avec l'Institut Pasteur de Lille depuis 2003. Les deux entités ont officialisé ce partenariat dans le but de partager du matériel et des expertises au sein de PEGASE-biosciences (Plateforme d'Expertises Génomiques Appliquées aux Sciences Expérimentales). Cette plateforme a oeuvré comme collaborateur du projet sur la partie identification par séquençage haut-débit des nématodes contaminant les échantillons de poissons. La thèse était placée sous le co-encadrement de Christophe AUDEBERT.

Cette thèse a été suivie par un comité de suivi de thèse une fois par an pendant la première et la deuxième année. Ce comité était composé de Véronique VERREZ-BAGNIS de l'Ifremer, Nantes, de Jean DUPOUY-CAMET de l'Université Paris Descartes - Hôpital Cochin, Paris et des Directeur, co-directeurs et encadrants de la thèse. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication (Annexe 4) et trois autres sont en cours de rédaction. Par ailleurs, plusieurs présentations orales et affichées ont été effectuées pendant plusieurs congrès et journées scientifiques durant 2013-2015.

Remerciements

Aux membres du jury :

Veillez recevoir l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté de juger mon travail mais aussi pour l'intérêt que vous lui portez.

Au Professeur Jean Dupouy-Camet

Vous m'avez mis toujours en avant quand il y avait des congrès intéressants, quand vous avez rencontré des collègues qui pouvaient être en lien avec mon projet professionnel. De plus, votre connaissance des sciences et votre gentillesse permettent votre renommée et le respect de la communauté scientifique dans le domaine de la parasitologie.

Au Docteur Hicham El Alaoui

Je suis très honorée par votre disponibilité et vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de mon manuscrit et membre du jury pour cette thèse.

Au Professeur Jean-Lou Justine

J'ai assisté à votre présentation au congrès de la SFP en 2014, avec vous la science n'est pas ennuyeuse car vous savez la raconter avec humour.

Au Docteur Patrick Fach

Je vous ai croisé à plusieurs journées scientifiques et congrès, j'ai beaucoup apprécié votre sympathie et votre expertise. Je suis très honorée que vous ayez accepté de participer à mon jury de thèse.

Au Docteur Véronique Verrez-Bagnis,

Quand on a des doutes sur les poissons, on sait qu'on peut compter sur vous. Vous êtes vraiment une experte dans le domaine du poisson. Vous êtes de plus très sympathique et souriante. Merci d'avoir accepté d'être le membre de jury invité.

Au Docteur Eric Viscogliosi

Merci de m'avoir permis d'être en thèse et merci d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse après le décès d'Eduardo. Tu es à l'écoute. A chaque fois que tu passais dans le labo, tu nous as fait plein de blagues. Merci surtout de m'avoir accordé une grande liberté pour réaliser mes différentes expériences pendant la thèse, cela m'a permis d'apprendre!

Au Docteur Cécile-Marie Aliouat-Denis

Merci d'avoir pris le relais d'Eduardo. Tu es très constructive dans l'encadrement. Tu es toujours disponible pour moi quand j'ai besoin de conseils. Ce que je retiens de toi c'est « push the limit ». Je dois pousser ma limite. Merci pour ta patience.

Au Docteur Mélanie Gay

Tu as commencé fort. Ta première thésarde encadrée n'est pas francophone, n'ayant pas de formation initiale pure en biologie moléculaire. Merci d'avoir tout fait pour que je puisse être en thèse. Tu es très patiente avec moi. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

Au Christophe Audebert

Merci de m'avoir encadrée sur le séquençage à haut-débit, la *qPCR* et pleins de conseils jusqu'au bout de la thèse. Heureusement que les toilettes sont près du labo BDPEE, j'ai pu profiter de ton passage pour te poser pleins de questions. En travaillant avec toi, j'ai l'impression qu'on a toujours la solution. Tu es mon gourou du séquençage à haut-débit.

Au Docteur Eduardo Dei-Cas, mon premier directeur de thèse,

Grâce à toi, j'ai pu entrer à l'école doctorale. Je ne te connaissais pas beaucoup. J'étais déçue de ne pas pouvoir apprendre la parasitologie avec toi. Mais je crois que tu m'as transmis un message important sur la grande qualité que les scientifiques doivent posséder pour travailler en équipe lors de notre premier rencontre à la réunion *Fish-Parasites*. Tu as ouvert tes bras en me disant bonjour Yuwalee, tu m'as pris par les épaules en me faisant la bise « Offrir du respect sincère, c'est s'enrichir », finalement par ce geste, je considère que tu m'as tout appris.

Au labo Anses site Boulogne sur mer :

Madame Anne Brisabois, Monsieur Pierre Malle

Je vous remercie de m'avoir permis de travailler au sein du laboratoire Anses et de mener à bien mon projet. J'admire votre parcours professionnel à tous les deux.

Mes collègues de mission parasitologie, Odile, Clémence

Les poissons, ça sent ! Des milliers de poissons que nous avons disséqués ensemble. Merci beaucoup pour votre aide pour toutes les manip nécessaires pour cette thèse.

Mes collègues thésards, Thomas, Mamadou, Estelle, Daline

Le bureau des thésards a grandi. Merci à vous de m'avoir supporté et accepté de partager le même bureau. Merci pour les rires et des bêtises qu'on a faites ensemble. Merci également à Daline notre collègue thésarde de l'ULCO. Merci en particulier à Thomas, le rugbyman, thésardman et mon prof

de musique pendant l'entracte de la rédaction « Allons enfants de la patrie. Le jour de gloire est arrivé » J'attends toujours la suite pour la chanter le 14 juillet.

Régine, Sophie, Stéphanie, Graziella, Monsieur Duflos, Karine, Corinne, Marie-Ange, Sylvie, Gaëlle, Cindy, Charlotte, Virginie, Sabine

Je vous remercie pour votre gentillesse et votre patience pour chaque question ou demande que je vous ai posée. Vous ne m'avez jamais dit non.

Au labo BDPEE et PEGASE :

Sophie, Renaud et Nausicaa, Merci de m'avoir formé pour le séquençage à haut-débit et d'autres manip. Vous êtes des experts ! J'ai beaucoup appris avec vous. **Alexandre, Gaël** Merci pour le développement du pipeline d'analyse et les conseils dans le domaine.

Sadia, tu es notre « Grand sister » parmi les thésards, je te remercie pour tous les conseils. Tu es très sympathique.

David, Gabriela, Stéphanie, Ludo, Léa, Romain, Anca, Karine, Emilie, Annie, Magalie, Pilar, El Moukhtar et Christine, Merci pour votre aide, gentillesse et toutes les réponses scientifiques ainsi que la vie pratique de votre part et tous les rires que nous avons partagés, le rangement du labo BDPEE en écoutant la musique de Mozart et d'Edith Piaf. « Non, rien de rien, non, je ne regrette rien. Ni le bien qu'on m'a fait, ni le mal, tout ça m'est bien égal..... »

Sara, Linh, Amandine, Dima, Marwan et Martha

BDPEE n'est pas seulement le laboratoire de Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents mais également de la diversité des étudiants car nous sommes libanais, française, vietnamienne et thaïlandaise. Nous avons partagé nos connaissances mais également nos cultures. Merci à vous tous !

Sarah et Linh, l'eau est bonne pour la santé! Notre vie étudiante à Lille est inoubliable.

Membres du réseau Fish-Parasites :

Cette thèse s'est intégrée dans ce grand projet ANR. Merci aux membres du réseau. Je remercie en particulier **Anne Thébault et Sonia Poisson** qui m'ont accordé du temps pour l'étude statistique. Merci à Monsieur **Alexandre Rado** pour tous les conseils statistiques. Merci à **Diane Cuzzucoli** pour la base de données Parafish.

L'océane (M et Mme Bardeaux) :

Merci de m'avoir fourni des échantillons biologiques. Grâce à vous le travail devient plus facile.

Aux personnels de l'Université Lille2

Je remercie le Directeur de l'Ecole Doctorale de m'avoir permis de m'inscrire. Merci à **Madame Fofana, Monsieur Delcroix** et aux autres membres impliqués d'avoir mis à disposition tous les moyens nécessaires pour les étudiants.

André PEUCH

Merci à toi, tu fais partie de ma réussite. Tu n'as pas fait avancer que l'aéronautique mais aussi la science. Je te suis très reconnaissant.

Jean-Louis Bigot, Chef de campagne PELMED

Pour tes conseils et ta gentillesse pendant les campagnes en mer PELMED 2011 et 2012. Je ne me suis jamais sentie étrangère quand je discutais avec toi. Tu es très sympathique.

Les professeurs de l'IUT et IUP,

Merci à tous les professeurs, Monsieur Tavernier, Madame et Monsieur Lencel, Monsieur Grand, Madame Ethuin, Monsieur Baclet, Monsieur Watier, Madame Cojez, Madame Chloé et tous les professeurs dont je n'ai pas mentionné le nom ici.

Professeur de l'Institut de Touraine et C.A.R.E.L

C'est avec vous que j'ai appris le français. C'est la base de tout pour ma vie et ma carrière en France.

Service des Affaires éducatives

Pour l'efficacité de votre service qui permet le bon déroulement tout au long de mes séjours en France depuis 11 ans. Merci beaucoup !

Ministères de sciences et technologies de Thaïlande

Je remercie les ministères de sciences et technologies, financeur de ma bourse.

ขอขอบพระคุณผู้ที่ให้ทุนการศึกษา กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Les professeurs de mon lycée Chiang Khan,

Merci à tous les professeurs qui m'ont appris toutes les connaissances requises.

ขอขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอนให้มีความรู้

A mes amis :

Amandine Delplanque et sa famille

Ma binome, merci de m'avoir fait confiance. Tu m'as beaucoup aidé tout au long de notre parcours depuis le DUT jusqu'au Master 2. Ta famille est formidable.

Mes amis de l'IUT et IUP

Merci à Julien Varlet, Nicolas Lourdel mes binomes d'IUT. Merci également à Elodie, Elise et Solène

Supanee, Duangnapa, Kasem, Tidarut et les amis de Royan

Première génération de la bourse ODOS1 (one district, one scholarship). Nous avons passé un an ensemble à Royan pour apprendre le français. C'était une année de découverte de la France ensemble. Nous sommes dingues!

Gigi et Jean-Paul,

Merci pour votre accueil à Royan. Je ne vous oublierai jamais, ma famille d'accueil de français.

Pinhathai, Chiranat, Phanuphong (เช็กซี),

Merci pour notre amitié et notre fidélité depuis l'école maternelle et le lycée.

ขอบคุณที่เป็นเพื่อนกันตลอดไม่เปลี่ยนแปลงมาจากชั้นอนุบาลและมัธยม และขอบคุณน้องรักเช็กซีที่รักเจ้าเสมอมา

Utumporn (อุทุมพร), Sribai (สีระบาย), Pi Ba (พีบ๊ะ) et Kob(ช่างกบ)

Grâce à ce stage de fin Master 1, j'ai pu vous rencontrer. Même si ce n'est que 3 mois de stage. C'est suffisant pour nous attacher toute la vie.

ขอบคุณการฝึกงานระดับปริญญาโทปีที่ 1 ถึงแม้เพียงแค่ 3 เดือน แต่มันก็เพียงพอที่จะทำให้เราเป็นเพื่อนกันตลอดชีวิต

Narapong et Yingyai

ขอบคุณสำหรับความช่วยเหลือทุกอย่างคะ

Je tiens à remercier encore une fois tous mes collègues. Cette thèse n'est pas que ma réussite mais c'est la réussite de tout le monde dans les trois laboratoires impliqués, des efforts de tous les acteurs. Je remercie mes encadrants et le comité de suivi de thèse qui m'ont guidée tout au long de la thèse.

A ma belle famille,

Didier, Marie-Martine, Caroline, Brice et les filles Jade et Leïla, Papi Michel, Mamie Suzanne, Papi Paul, Mamie Paule, Tonton Alain (merci pour les cours de chant « ha ha ha ha haaa... ») et Tata Sylvie, avec vous, je me sens comme dans ma famille en France.

A Alexandre Dehaut,

Je te remercie du fond de mon cœur pour toute l'aide que tu m'as apportée. Tu es toujours là pour me soutenir. Merci pour ta patience, merci pour ta disponibilité à toutes les questions scientifiques, informatiques pour ma thèse et tes encouragements. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi.

A mes parents et toute ma famille,

Papa Nhupin, maman Jintana, merci de m'avoir donnée la vie, de m'avoir appris des choses essentielles à la vie et surtout de m'aimer inconditionnellement.

Grand-père Udom, grande-mère Luem, merci de m'aimer, de m'avoir appris des choses : pêcher, chercher de l'or dans le Mékong et tisser...

Ma tante Duangdao, ma petite sœur Rudsamee, mon petit frère Chakri et ... Mangkorn

Quel que soit l'endroit où je suis, vous êtes toujours avec moi dans mon cœur.

Merci pour votre soutien,

ขอบพระคุณ คุณพ่อหนูปินและคุณแม่จินตนา สีเส้า ที่ได้ให้ชีวิตลูกคนนี้ ให้ความรักและทุกอย่าง ลูกจึงมีวันนี้ได้
ถึงคุณตาอุดมและคุณยายเหลื่อม พรหมมาวันนา ขอบพระคุณที่ให้ความรักและอบรมสั่งสอนถ่ายทอดชีวิตความเป็นอยู่ ประเพณีและวัฒนธรรมให้

ถึงคุณน้ำดวงดาวพรหมมาวันนา น้องสาวรัศมี สีเส้า น้องชายจักรี พรหมมาวันนา และหลานรัก มังกร ขอบคุณ
ความรักและกำลังใจที่มีให้กัน

ทุกคนอยู่ในใจเสมอ

En l'honneur de mes gourous !

Life must be easy. If it is not easy, it is not right.

ชีวิตมันต้องง่าย ถ้ามันไม่ง่ายแสดงว่ามันผิด

Jone Jandai

โจน จันได

Il ne faut pas croire que les autres sont plus bêtes que soi, qu'ils sont plus intelligents que soi, voire qu'ils sont au même niveau que soi. Toutes ces affirmations sont fausses!

ความเห็นที่เราดีกว่าคนอื่น เห็นว่าเราเสมอเขา เห็นว่าเราโง่กว่าเขา นี่เป็นความเห็นอันผิดทั้งนั้น

Chah Subhaddo (Chao Khun Bodhinyana Thera)

สมเด็จพระโพธิญาณเถร

Dans ce monde, ceux qui se basent sur la raison se disputent le plus mais ceux qui ont du cœur ne le font pas.

โลกนี้คนมีเหตุผลทะเลาะกันมากที่สุด แต่คนที่มีหัวใจ ไม่ทะเลาะกัน

Dr. Woraphat Phucharoen

ดร. วรภัทร์ ภู์เจริญ

Happiness is here and now...

ความสุขอยู่ที่นี้และตรงนี้

Plumvillage

Table des matières

Avant-propos.....	1
Remerciements	2
Table des matières	11
Table des figures.....	18
Table des tableaux.....	24
Table des annexes	27
Abréviations	28
Lexique	31
Introduction.....	32
Etude bibliographique	34
I. Taxonomie et cycle biologique des Anisakidae.....	34
I.1. Le genre <i>Anisakis</i>	35
I.2. Le genre <i>Pseudoterranova</i>	38
I.3. Le genre <i>Contracaecum</i>	40
I.4. Le genre <i>Hysterothylacium</i>	41
II. Distribution des Anisakidae dans les différents types d'hôtes et facteurs influençant leur distribution	44
II.1. Distribution des Anisakidae par espèce hôte	44
II.1.1. Hôte intermédiaire	44
II.1.2. Hôte paraténique	46
II.1.3. Hôte définitif	53
II.2. Distribution géographique des genres et espèces d'Anisakidae.....	55
II.2.1. <i>Anisakis</i> spp., Dujardin, 1845	57
II.2.2. <i>Pseudoterranova</i> spp., Mozgovoi, 1951.....	60
II.2.3. <i>Contracaecum</i> spp., Railliet & Henry, 1912.....	61
II.2.4. <i>Hysterothylacium</i> spp., Ward & Magath, 1917.....	63

II.3. Les différents facteurs impactant la distribution des Anisakidae	64
II.3.1. Facteurs intrinsèques	65
II.3.2. Facteurs extrinsèques.....	66
II.4. Distribution des Anisakidae dans les différents organes ou tissus des poissons.....	69
III. Impact des Anisakidae sur la santé humaine	72
III.1. Clinique de l'Anisakidose et allergie.....	72
III.1.1. Définition et historique de la maladie.....	72
III.1.2. Réponse immunitaire vis-à-vis des Anisakidae	73
III.1.3. Les différentes formes cliniques de l'Anisakidose	74
III.2. Diagnostic et traitement	80
III.3. Epidémiologie de l'Anisakidose.....	81
III.4. Facteur de contamination	84
IV. Impact des Anisakidae sur la filière pêche	85
IV.1. Données de consommation des produits de la pêche.....	85
IV.2. Méthodes de maîtrise du risque et élimination parasitaire dans les produits de la pêche..	87
IV.2.1. Eviscération précoce	87
IV.2.2. Inspection visuelle.....	87
IV.2.3. Découpe.....	88
IV.2.4. Ecrasement par presse hydraulique et observation sous lumière UV	89
IV.2.5. Digestion pepsique.....	89
IV.3. Règlements et prévention face au risque parasitaire	90
IV.4. Impact des méthodes de conservation sur la viabilité des Anisakidae.....	96
IV.4.1. La résistance d'Anisakis à différentes conditions environnementales	96
IV.4.2. Efficacité reconnue de la température sur les Anisakidae.....	96
IV.4.3. Méthodes de transformation et de préservation des produits de la pêche.....	97
IV.4.4. Autres méthodes alternatives de préservation des produits de la pêche	100
V. Les méthodes d'identification des Anisakidae	102

V.1. Identification morphologique	102
V.1.1. Larve de stade L3 appartenant au genre <i>Anisakis</i> spp.	103
V.1.2. Larve de stade L3 appartenant au genre <i>Pseudoterranova</i> spp.	104
V.1.3. Larve de stade L3 appartenant au genre <i>Contracaecum</i> spp.....	104
V.1.4. Larve de stade L3 appartenant au genre <i>Hysterothylacium</i> spp.	105
V.2. Identification par les méthodes biochimiques.....	105
V.2.1. MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis)	105
V.2.2. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	106
V.3. Identification par les méthodes moléculaires.....	106
V.3.1. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	106
V.3.2. La PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel (rtPCR).....	108
V.4. Métagénétique et utilisation du séquençage à haut-débit	109
V.4.1. Les étapes clés du séquençage haut-débit de 2 ^{ème} génération pour son application en métagénétique	112
V.4.2. L'analyse bioinformatique des données de séquençage à haut débit.....	116
Objectifs de thèse.....	119
Matériels et méthodes.....	121
I. Echantillonnage des espèces de poisson, collecte des parasites et choix des méthodes permettant leur identification	121
I.1. Echantillonnage	121
I.2. Protocole de dissection des poissons.....	127
I.3. Choix des méthodes moléculaires pour l'identification des Anisakidae dans les poissons ..	130
II. Identification des Anisakidae par la méthode de séquençage <i>Sanger</i> pour le <i>locus COX2</i>	132
II.1. Extraction d'ADN en vue du séquençage <i>Sanger</i>	132
II.2. Protocole d'amplification	132
II.3. Séquençage des produits amplifiés et identification des parasites	133
III. Identification des Anisakidae par la méthode de séquençage à haut débit au <i>locus COX2</i>	133

III.1. Base de données de séquences du gène mitochondrial <i>COX2</i>	134
III.2. Extraction d'ADN en pool à partir des nématodes Anisakidae	134
III.2.1. Mise au point de l'extraction d'ADN en pool et détermination de la quantité d'ADN / Optimisation des conditions de réalisation de la PCR de librairie	135
III.2.2. Extraction d'ADN des échantillons de l'étude.....	136
III.3. Design d'un nouveau couple d'amorces compatible avec la méthode de séquençage à haut débit	138
III.4. PCR en point final indexée pour le séquençage à haut débit des Anisakidae.....	139
III.4.1. Condition de la PCR de librairie	139
III.4.2. Indexation des amorces pour la PCR de librairie.....	140
III.4.3. Préparation de la librairie en PCR pour la librairie	143
III.5. Le mélange équimolaire	144
III.6. Amplification clonale par PCR en émulsion.....	144
III.7. Le séquençage à haut débit (PGM™ Ion Torrent plateforme)	148
III.7.1. Initialisation du système.....	149
III.7.2. Préparation du chargement de la puce de séquençage.....	149
III.7.3. Vérification de la puce « Chip check ».....	150
III.7.4. Ajout de la Taq polymérase à la matrice ISPs positive	150
III.7.5. Chargement de la puce	150
III.7.6. Contrôle qualité des séquences issues du séquençage	152
III.8. Elaboration du pipeline d'analyse pour le traitement des séquences issues du séquençage haut débit	153
III.9. Expérience pilote de séquençage et <i>Benchmark</i>	156
III.9.1. Echantillon de pilote.....	156
III.9.2. Préparation du Benchmark	157
III.9.3. Séquençage à haut débit de l'étude pilote	157
III.10. Expériences en <i>qPCR</i> pour la transformation des résultats semi-quantitatifs du <i>HTS</i> en nombre d'Anisakidae relatif.....	160

III.10.1.	Clonage du locus COX2 d'Anisakis simplex.....	160
III.10.2.	Expérience de qPCR.....	160
III.11.	Séquençage à haut-débit (PGM™ ION TORRENT) des échantillons étudiés.....	161
IV.	Analyse statistique des résultats.....	161
Résultats et discussion		163
I.	Mise au point des différents modules techniques constituant la méthode HTS.....	163
I.1.	Extraction de l'ADN à partir d'un mélange d'Anisakidae	163
I.2.	Détermination des conditions de la PCR pour la préparation de la librairie de HTS	165
I.3.	Base de données.....	166
I.4.	Design du couple d'amorces pour la PCR pour la préparation de la librairie de HTS	167
I.5.	Pipeline d'Analyse « Nonnoy ».....	170
I.6.	Résultats de l'expérience pilote de séquençage haut-débit	170
I.7.	Estimation du nombre de copies d'ADN mitochondrial des Anisakidae par qPCR	174
I.7.1.	Etude des différences inter-genre.....	176
I.7.2.	Etude des différences inter-espèce.....	176
II.	Analyse descriptive des échantillons de poisson de l'étude	180
II.1.	Espèces échantillonnées.....	180
II.2.	Taille des poissons	180
II.3.	Poids des poissons.....	181
II.4.	Sexe des poissons	182
II.5.	Type de poisson.....	183
II.6.	Provenance des poissons	183
II.7.	Saison de pêche.....	184
II.8.	Zones de pêche.....	185
III.	Résultats de l'identification moléculaires des nématodes Anisakidae	187
III.1.	Identification des Anisakidae par séquençage <i>Sanger</i>	187
III.2.	Identification des Anisakidae par séquençage HTS.....	187

III.3. Distribution des Anisakidae dans les seize espèces de poisson infectées selon différentes zones géographiques.....	192
III.3.1. Distribution géographique des espèces du genre <i>Anisakis</i>	192
III.3.2. Distribution géographique des espèces du genre <i>Contracaecum</i> et <i>Phocascaris</i> ..	196
III.3.3. Distribution géographique des espèces du genre <i>Pseudoterranova</i>	198
III.3.4. Distribution géographique des espèces du genre <i>Hysterothylacium</i>	200
III.3.5. Synthèse des différentes répartitions des Anisakidae	201
III.3.6. Quelques observations sur la distribution des Anisakidae dans certaines espèces de poisson	202
III.4. Prévalence et proportion de la contamination par les Anisakidae	203
III.4.1. Proportion dans les différentes localisations corporelles du poisson	203
III.4.2. Prévalence des différents genres d'Anisakidae dans les différentes localisations corporelles pour l'ensemble des poissons	204
III.4.3. Prévalence globale des Anisakidae dans les localisations corporelles les plus consommées	207
III.4.4. Proportion dans les différentes espèces de poisson.....	209
III.4.5. Prévalence des différents genres d'Anisakidae dans différentes localisations corporelles par espèce de poisson.....	210
III.4.6. Prévalence d' <i>Anisakis</i> et de <i>Pseudoterranova</i> dans les 16 espèces de poissons par zone de pêche	226
III.5. Intensité du parasitisme par les Anisakidae.....	232
III.5.1. Nombre d'Anisakidae de chaque genre identifiés dans les espèces de poisson	232
III.5.2. Intensité moyenne des différents genres d'Anisakidae dans les localisations corporelles des poissons	233
III.5.3. Intensité moyenne des différents genres d'Anisakidae dans les espèces de poisson	233
IV. Etudes de facteurs influençant la prévalence des Anisakidae dans les poissons	245
IV.1. Résultats du modèle logistique multivarié appliqué aux données de prévalence et prédiction de la prévalence d' <i>Anisakis</i> et de <i>Pseudoterranova</i>	245

IV.1. Prédiction de la prévalence par le modèle logistique multivarié	250
IV.2. Relations entre les prévalences parasitaires.....	253
IV.2.1. Analyse des correspondances multiples	253
IV.2.2. Application à la protection des consommateurs	258
Conclusions et perspectives	261
Références bibliographiques.....	268
Annexes	291

Table des figures

Figure 1 : Taxonomie des Anisakidae selon Hartwich (1974).....	34
Figure 2 : Morphologie macroscopique d' <i>Anisakis</i> spp.	36
Figure 3 : Cycle biologique d' <i>A. simplex</i> (Audicana et Kennedy, 2008).....	37
Figure 4 : Morphologie macroscopique de <i>Pseudoterranova</i> spp.	38
Figure 5 : Cycle biologique de <i>Pseudoterranova decipiens</i> selon Stoskopf (1993).	39
Figure 6 : Morphologie macroscopique de <i>Contracaecum</i> spp. (13 mm).....	40
Figure 7 : Cycle biologique de <i>Contracaecum osculatum</i> selon Kjøie et Fagerholm (1995).	41
Figure 8 : <i>Hysterothylacium</i> spp. extrait de la lumière de l'estomac d'un cabillaud (<i>Gadus morhua</i>). 42	
Figure 9 : Cycle biologique d' <i>Hysterothylacium aduncum</i> selon Kjøie (1993).	43
Figure 10 : Phénomènes de co-évolution suspectés entre les espèces d' <i>Anisakis</i> spp. (COX2)	53
Figure 11 : Relation entre les espèces de <i>Contracaecum</i> spp. (COX2)et leurs hôtes pinnipèdes (12s, 16s et Cytochrome b).	54
Figure 12 : Distribution des nématodes appartenant au genre <i>Pseudoterranova</i> et au complexe <i>Contracaecum osculatum</i> chez leurs hôtes pinnipèdes (Mattiucci et Nascetti, 2008).....	55
Figure 13 : Carte de répartition des Anisakidae (<i>Anisakis</i> , <i>Pseudoterranova</i> , <i>Contracaecum</i> et <i>Phocasaris</i>) dans le monde (Mattiucci et Nascetti, 2008).....	56
Figure 14 : Schéma représentant les différents niveaux marins avec quelques exemples d'espèces marines.....	68
Figure 15 : Réponse immunitaire de l'Homme vis-à-vis d' <i>A. simplex</i> (Nieuwenhuizen et Lopata, 2013)	73
Figure 16 : Technique de parage d'un filet (Angot et Brasseur, 1995) ,les points noirs représentent la distribution théorique des kystes d'Anisakidae	89
Figure 17 : Caractères morphologiques discriminants des larves L3 d'Anisakidae.....	103
Figure 18 : Photos d' <i>Anisakis</i> spp. L3	104
Figure 19 : Photos d'une larve de <i>Pseudoterranova</i> spp. de stade L3 (A).....	104
Figure 20 : Larve de stade L3 du genre <i>Contracaecum</i> spp.....	105
Figure 21 : Photo d' <i>Hysterothylacium</i> spp. au stade adulte	105

Figure 22 : Principe de la <i>PCR</i> -SSCP	108
Figure 23 : Schéma récapitulatif des étapes clés des différentes technologies de séquençage (<i>Sanger</i> , séquençage à haut-débit de 2 ^{ème} et 3 ^{ème} génération).....	111
Figure 24 : Schéma illustrant le principe de séquençage de paillasse PGM™ Ion Torrent utilisé dans l'étude.	113
Figure 25 : Propriétés de différents séquenceurs de 2 ^{ème} génération	114
Figure 26 : Champs d'application des différents séquenceurs de 2 ^{ème} génération	115
Figure 27 : Requête dans PUBMED des pipelines d'analyses de bioinformatiques publiés depuis 1998.	117
Figure 28 : Requête dans PUBMED des pipelines d'analyse de bioinformatiques publié depuis 1998.	118
Figure 29 : Zone de pêche FAO 27 Atlantique Nord-Est.....	124
Figure 30 : zone de pêche 37 mer Méditerranée et mer Noire.	124
Figure 31 : Diagramme des étapes de dissection du poisson	128
Figure 32 : Schéma de la prise de décision	131
Figure 33 : Schéma global du développement des différentes étapes du séquençage à haut-débit.	134
Figure 34 : Photographie d'un Ultra-Turrax Tube drive (A), et de l'extraction d'ADN en pool par le kit AXG NucleoBond (B).....	137
Figure 35 : Positions des amorces F-univ-nem <i>COX2</i> , R1-univ-nem <i>COX2</i> , et R2-univ-nem <i>COX2</i> , 210/211 (Valentini <i>et al</i> , 2006), F-univ-nem/R-univ-nem.....	139
Figure 36 : Principe de la <i>PCR</i> en point final indexée.....	142
Figure 37 : Appareil E-gel sizeSelect.....	144
Figure 38 : Plateforme Ion OneTouch™2 utilisée pour la <i>PCR</i> en émulsion nécessaire à la phase d'amplification clonale.....	145
Figure 39 : Schéma de la <i>PCR</i> en émulsion.....	146
Figure 40 : Filtre réceptionnant le mélange réactionnel de la <i>PCR</i> en émulsion.	147
Figure 41 : Image du tube <i>recovery</i> contenant les produits de <i>PCR</i> en émulsion	148
Figure 42 : plateforme PGM™ Ion Torrent	149

Figure 43 : Elimination du liquide de la puce (A), centrifugation de la puce (B).....	150
Figure 44 : Chargement de la matrice ISP positive sur la puce (A), en tournant la pipette (B).	151
Figure 45 : Position "pointing in" pour la centrifugation de la puce de séquençage.....	151
Figure 46 : Insertion de la puce après avoir injecté la matrice de séquençage.	152
Figure 47 : Contrôle qualité des séquences issues du séquençage par le serveur Torrent qui donne le format de séquence final en FASTQ.....	152
Figure 48 : Le <i>pipeline</i> d'analyse "Nonnoy" tel qu'il peut être représenté au sein du moteur de workflows Galaxy.	153
Figure 49 : Enchaînement des workflows du <i>Pipeline</i> d'analyse "Nonnoy"	154
Figure 50 : impression d'écran de l'Interface Galaxy	156
Figure 51 : Schéma du séquençage à haut débit pour l'identification des Anisakidae.....	159
Figure 52 : Positions du couple d'amorces R-univ-nem <i>COX2</i> /F-univ-nem <i>COX2</i> sur la séquence du gène mitochondrial <i>COX2</i> d' <i>A. simplex</i> . Le fragment total amplifié du gène <i>COX2</i> a une taille attendue de 440 pb.....	168
Figure 53 : Séparation des produits d'amplification au locus <i>COX2</i> après électrophorèse sur gel d'agarose.....	169
Figure 54 : Boxplot illustrant le rapport de la quantité de mitochondries en fonction de la quantité d'ADN pour chaque espèce d'Anisakidae (même échantillons du test statistique).	177
Figure 55 : Effectifs des dix-huit espèces de poisson sélectionnées.....	180
Figure 56 : Taille moyenne des 18 espèces de poissons (1 768 poissons).....	181
Figure 57 : Poids moyen des 18 espèces de poisson (1 768 poissons).	182
Figure 58 : Sexe des 18 espèces de poisson (1768 poissons).....	182
Figure 59 : Pourcentage de type de poisson gras, maigre et semi-gras (1768 poissons)	183
Figure 60 : Répartition des poissons échantillonnés par type : gras, maigre et semi-gras (1 768 poissons).....	183
Figure 61 : Répartition (en %) des 1 768 poissons de 18 espèces échantillonnées en fonction des 4 saisons.	184
Figure 62 : Répartition du nombre de poissons échantillonnés dans les différentes zones de pêche (nomenclature FAO).	185

Figure 63 : Distribution des espèces appartenant au genre <i>Anisakis</i> dans les 16 espèces de poisson	193
Figure 64 : Distribution des espèces appartenant aux genres <i>Contracaecum</i> et <i>Phocascaris</i> dans seize espèces de poisson.....	196
Figure 65 : Distribution des espèces appartenant au genre <i>Pseudoterranova</i> dans seize espèces de poisson	198
Figure 66 : Distribution des espèces appartenant au genre <i>Hysterothylacium</i> dans seize espèces de poisson	200
Figure 67 : Nombres d'Anisakidae identifiés dans le merlu (<i>Merluccius merluccius</i>) dans différentes localisations corporelles en fonction de la zone de pêche (échelle logarithmique).....	202
Figure 68 : Nombres d'Anisakidae identifiés dans le maquereau commun (<i>Scomber scombrus</i>) dans différentes localisations corporelles en fonction de la zone de pêche (échelle logarithmique).....	203
Figure 69 : Proportion des Anisakidae dans les différentes localisations corporelles des 1 768 poissons analysés.....	204
Figure 70 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae dans les différentes localisations corporelles de l'ensemble des poissons.....	205
Figure 71 : Prévalence globale des Anisakidae dans les viscères, les viscères et filets et les filets des 1 768 poissons analysés appartenant à 18 espèces.....	207
Figure 72 : Prévalence des Anisakidae dans les viscères de 1 768 poissons classés par espèce de poisson et par prévalence décroissante.....	208
Figure 73 : Prévalence des Anisakidae dans les filets de 1 768 poissons classés par espèce de poisson et par prévalence décroissante.....	208
Figure 74 : Prévalence des Anisakidae et des nématodes non identifiés dans les 18 espèces de poisson classés par prévalence décroissante.....	209
Figure 75 : Prévalence totale des Anisakidae dans les 1 768 poissons classés par prévalence décroissante.....	210
Figure 76 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du hareng (<i>Clupea harengus</i>).....	211
Figure 77 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	212

Figure 78 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de l'anchois (<i>Engraulis encrasicolus</i>).....	213
Figure 79 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du cabillaud (<i>Gadus morhua</i>).....	214
Figure 80 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la cardine franche (<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>).....	215
Figure 81 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la baudroie (<i>Lophius piscatorius</i>).	216
Figure 82 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de l'églefin (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>).	217
Figure 83 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du merlan (<i>Merlangius merlangus</i>).....	217
Figure 84 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du merlu (<i>Merluccius merluccius</i>).	218
Figure 85 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la langue bleue (<i>Molva dypterygia</i>).....	219
Figure 86 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la langue franche (<i>Molva molva</i>).....	220
Figure 87 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du lieu noir (<i>Pollachius virens</i>).	221
Figure 88 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la sardine commune (<i>Sardina pilchardus</i>).....	223
Figure 89 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du maquereau espagnol (<i>Scomber japonicus</i>).....	224
Figure 90 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du maquereau commun (<i>Scomber scombrus</i>).	225
Figure 91 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la sole (<i>Solea solea</i>).	226
Figure 92 : Carte de prévalence d' <i>Anisakis</i> dans les filets des 1 768 poissons.	228
Figure 93 : Carte de prévalence de <i>Pseudoterranova</i> dans les filets de 1 768 poissons.	230

Figure 94 : Intensité des genres d'Anisakidae par espèce de poisson y compris les espèces non identifiées (échelle logarithmique).	232
Figure 95 : Intensité moyenne des Anisakidae dans chaque localisation corporelle pour les 1 768 poissons.....	233
Figure 96 : Intensité moyenne d' <i>Anisakis</i> dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.....	234
Figure 97 : Intensité moyenne de <i>Pseudoterranova</i> dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.	234
Figure 98 : Intensité moyenne de <i>Contracaecum</i> dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.....	235
Figure 99 : Intensité moyenne de <i>Hysterothylacium</i> dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.	236
Figure 100 : Intensité moyenne des genres d'Anisakidae dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.....	236
Figure 101 : graphiques représentant la prédiction de la prévalence d' <i>Anisakis</i> et <i>Pseudoterranova</i> dans les filets de la baudroie, la lingue bleue, le maquereau commun et l'anchois en se basant sur la taille des poissons.	250
Figure 102 : Graphique des contributions des différentes variables aux axes 1 et 2 de l'analyse des correspondances Multiples.....	254
Figure 103 : Nuage des individus représentés par le point moyen de chaque modalité selon les axes 1 et 2 de l'analyse des correspondances Multiples.	255
Figure 104 : Graphique des contributions des différentes variables aux axes 2 et 3 de l'analyse des correspondances Multiples.....	257
Figure 105 : Nuage des individus représentés par le point moyen de chaque modalité selon les axes 2 et 3 de l'analyse des correspondances Multiples.	258
Figure 106 : Graphique représentant la prédiction de probabilité d'observer des larves d' <i>Anisakis</i> dans les filets	259

Table des tableaux

Tableau I : Hôtes intermédiaires des Anisakidae (mis à jour d'après Augry, 2012).....	45
Tableau II : Exemple d'hôtes Céphalopodes hébergeant des Anisakidae (d'après Augry, 2012).	46
Tableau IIIa: Prévalence des Anisakidae dans 53 espèces de poissons de mer	48
Tableau IV : Prévalence des Anisakidae dans les muscles de différentes espèces de poisson.....	71
Tableau V : Différentes formes cliniques de l'Anisakidose classées par la localisation des signes cliniques chez l'hôte accidentel : formes gastrique, intestinale, ectopique, oesophagienne et allergique à <i>A. simplex</i>	79
Tableau VI : Tonnages, pour les années 2003, 2011 et 2012, des espèces et genres de poisson marin les plus pêchés.....	86
Tableau VII : Espèces de poisson les plus consommées en France de 2009 à 2014. (FranceAgriMer, 2015).....	87
Tableau VIII : Résistance des larves d' <i>Anisakis</i> sp. soumises à différents conditions environnementales	96
Tableau IX : Différentes conditions de marinage des produits de la pêche efficaces contre les Anisakidae.	100
Tableau X : Récapitulatif des 15 espèces de poisson échantillonnées durant le programme <i>Fish-Parasites</i>	123
Tableau XI : Espèces de poisson prévues dans le plan d'échantillonnage en fonction des zones de pêche.....	125
Tableau XII : Numérotation des échantillons	127
Tableau XIII : Mélange réactionnel de la <i>PCR</i> en point final indexée.....	140
Tableau XIV : Mélange réactionnel pour la <i>PCR Forward</i>	143
Tableau XV : Mélange réactionnel pour la <i>PCR Reverse</i>	143
Tableau XVI : Mélange réactionnel pour la <i>PCR</i> en émulsion en phase d'amplification clonale.	147
Tableau XVII : Quantité d'ADN des 4 genres d'Anisakidae utilisée en <i>Benchmark</i> pour le premier pilote de séquençage <i>HTS</i>	156
Tableau XVIII : Benchmark de pilotes de séquençage <i>HTS</i>	157
Tableau XIX : Première comparaison des quatre méthodes d'extraction d'ADN.	163

Tableau XX : Comparaison des deux meilleures méthodes d'extraction d'ADN sélectionnées.	164
Tableau XXI : Espèces d'Anisakidae présentes dans la base de données locale pour le <i>pipeline</i> d'analyse Nonnoy.....	166
Tableau XXII : Liste des séquences des autres nématodes récoltées pour l'élaboration de la banque de données locale.....	167
Tableau XXIII : Caractéristiques du couple d'amorces F-CA-univ –nem <i>COX2</i> / R2-YS-univ-nem <i>COX2</i> conçu pour le séquençage <i>HTS</i>	168
Tableau XXIV : Qualité et concentration des ADN utilisés pour la validation des amorces.....	169
Tableau XXV : résumé des caractéristiques techniques du run pilote de séquençage <i>HTS</i> sur la puce 314 Chip V2	171
Tableau XXVI : Comparaison des proportions des différents genres dont l'ADN a été extrait avec les proportions obtenues en <i>HTS</i> séquences de pilote de séquençage obtenues (%) et le composant de <i>Benchmark</i>	171
Tableau XXVII : Moyennes et variations du nombre de mitochondries pour chaque genre d'Anisakidae.	175
Tableau XXVIII : Résultat de <i>p-value</i> du test <i>Rank Sum</i> de Wilcoxon pour la mise en évidence de différences significatives du nombre de mitochondries entre les genres d'Anisakidae.....	176
Tableau XXIX : Résultat de <i>p-value</i> du test <i>Rank Sum</i> de Wilcoxon pour la mise en évidence de la différence significative du nombre de mitochondries entre les espèces d'Anisakidae.....	176
Tableau XXX : Nombre de poissons et de localisations corporelles des poissons infectés par les différents genres d'Anisakidae et nombre de parasites correspondant identifiés par la méthode de séquençage <i>Sanger</i>	187
Tableau XXXI : Nombre de poissons et de localisations corporelles des poissons infectés par les différents genres d'Anisakidae et nombre de parasites correspondant identifiés par la méthode <i>HTS</i>	188
Tableau XXXII : Synthèse des caractéristiques des 6 runs de séquençage <i>HTS</i>	189
Tableau XXXIII : Nématodes non-Anisakidae identifiés dans les six runs de séquençage <i>HTS</i> , mais supprimés car présents à raison de 5 séquences ou moins par index.....	189
Tableau XXXIV : Calcul du prix de revient pour les 2 méthodes de séquençage utilisées : méthode <i>Sanger</i> et <i>HTS</i>	191

Tableau XXXV : Classement des huit espèces de poisson selon l'abondance moyenne des Anisakidae par poisson, la prévalence globale des parasites, leur prévalence dans les filets et dans les viscères.	243
Tableau XXXVI : Sélection des variables pour le modèle logistique multivarié	245
Tableau XXXVII : Résultats du modèle logistique multivarié.....	247
Tableau XXXVIII : Pourcentage des variances pour les douze axes explicatifs de la prévalence des différents genres d'Anisakidae dans la cavité corporelle, le foie et les filets.	254

Table des annexes

Annexe 1 : Nom des poissons des dix-huit espèces impliquées dans le projet classés selon le nom de la famille.....	291
Annexe 2 : Ensemble des espèces de poissons par zone de pêche non prévues du programme <i>Fish-Parasites</i>	294
Annexe 3 : Page d'accueil de la base de données PARAFISH constituée dans le cadre du programme <i>Fish-Parasites</i>	295
Annexe 4 : Premier article publié sur l'extraction d'ADN des Anisakidae.....	296
Annexe 5 : Valorisation du travail	302
Annexe 6 : Prévalence des 210 espèces de poissons issus de 100 articles publiés	309
Annexe 7 : Identification des <i>Blastocystis</i> et <i>Cryptosporidium</i> dans les poissons et mammifères marins pour le programme <i>ABC-Fish</i>	325
Annexe 8 : Résumé issu du séquençage HTS pilote	330
Annexe 9 : Résumé issu du séquençage HTS pour un run donné.	331
Annexe 10 : Les partenariats du programme Fish-Parasites.....	332
Annexe 11 : Prévalence d' <i>Anisakis</i> et de <i>Pseudoterranova</i> dans les filets présentée par zone de pêche.....	333
Annexe 12 : Calcul de l'intensité effectuée par l'Anses DER UEA, Unité Méthodologie et études (Direction de l'Evaluation des Risques, Unité d'Etude et Appui en Microbiologie et Santé Animale) de Maisons-Alfort.....	335
Annexe 13 : Description du modèle logistique et de la prédiction de la prévalence du modèle multivarié effectués par l'Anses DER UEA, Unité Méthodologie et études (Direction de l'Evaluation des Risques, Unité d'Etude et Appui en Microbiologie et Santé Animale) de Maisons-Alfort	336
Annexe 14 : Modèle logistique pour la prédiction de la présence de larves d' <i>Anisakis</i> dans les filets en fonction de l'intensité de larves d' <i>Anisakis</i> dans la cavité corporelle.	341

Abréviations

- A. sp: *Anisakis* sp, 51, 323
- AAM: macrophages activés alternatifs (Alternatively Activated Macrophages), 73
- Ab: *A. brevispiculata*, 51, 323
- ADN: Acide désoxyribonucléique, 106
- ADNm: ADN mitochondrial, 173
- AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 97
- Afssa: Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des Aliments, 93
- AIC: Akaike information criterion, 246
- ALIA: Alimentation et Industries Alimentaires, 1
- ANOVA: Analysis of variance, 174
- ANR: Agence Nationale de la Recherche, 1
- Anses: Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail, 122
- ANSES DER UEA MSA *Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail Direction de l'Evaluation des Risques, Unité d'Etude et Appui en Microbiologie et Santé Animale*
- Ap: *A. pegreffii*, 51, 323
- Aphyse: *A. physeteris*, 51, 323
- ARNr 16S: ARN ribosomique 16S, 109
- ARNr 18S: ARN ribosomique 18S, 108
- As: *A. simplex*, 51, 323
- As(sl): *A. simplex* (sensu lato), 51, 323
- As(ss): *A. simplex* (sensu stricto), 51, 323
- As-Ap: *A. simplex* x *A. pegreffii*, 51, 323
- At: *A. typica*, 51, 323
- Atl: Océan Atlantique, 51, 323
- Atl NE: Océan Atlantique Nord-Est, 51, 323
- ATP: Adénosine-5'-triphosphate, 112
- a_w : Activité de l'eau, 97
- Az: *A. ziphidarum*, 51, 323
- BDPEE *Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents*
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, 132
- BLASTn: Basic Local Alignment Search Tool databases using a nucleotide query, 138
- BMTs: Sterile Bead meal tube, 136
- BO: bowel ou intestin, 31
- C. sp: *Contracaecum* sp, 51, 323
- CALIPSO: Consommations Alimentaires de poissons et produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, polluants et oméga 3, 121
- CC: corporal cavity ou cavité corporelle, 31, 128
- CCP: *Critical Control Point* ou Point de control critique, 95
- CE: Commission Européenne, 97
- CEG: Côte d'Egypte, 51
- CEVPM: Centre Experimentation Et Valorisation Produits De la mer, 97
- CIIL *Centre d'Immunité d'Infection de Lille*
- Co: *C. osculatum*, 51, 323
- CO₂: Carbone Dioxyde, 101
- CRJ: Côte de Rio de Janeiro, 51
- Ct: Cycle threshold ou cycle de seuil, 162
- DDBJ: DNA Data Bank of Japan, 133
- DDP: Détroit de Puget, 51
- EBI: European Bioinformatics Institute, 133
- ECM: Matrice extracellulaire, 73
- Efsa: European Food Safety Authority ou Autorité européenne de sécurité des aliments, 99
- ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, 80
- EMMD: Est de la Mer Méditerranée, 51
- emPCR: emulsion PCR, 169
- FAO: Food and Agriculture Organization, 124

FcεR: Récepteur du fragment Fe de la chaîne ε des IgE, 74

FDA: Food and Drug Administration, 95

Fi: filets ou fillets, 31; fillets ou filets, 128

GBA: Grande baie d'Australienne, 51

gill: gills ou branchies, 128

GO: gonad ou gonades, 31, 128

GSM: Golfe de San Matias, 51

H. sp.: *Hysterothylacium* sp., 51, 323

Ha: *H. aduncum*, 51, 323

HACCP: Hazard Critical Control Point, 85

Hf: *H. fabri*, 51, 323

HTS: High Throughput Sequencing ou séquençage à haut-débit, 109

ICES: International Council for the Exploration of the Sea, 124

Ifremer *Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER*

IgE: Immunoglobuline E, 74

IL: Inter-Leukine, 73

ILC: Innate lymphoid cells ou cellules lymphoïdes innées, 73

InVS: Institut de veille sanitaire, 82

IPL: Institut Pasteur de Lille, 1

ISP: Ionosphere particle, 139

ITS1: Internal transcribed spacer 1, 107

ITS2: Internal transcribed spacer 2, 107

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, 137

kGy: kilogray, 101

L1: Larve stade 1, 36

L2: Larve stade 2, 36

L3: Larve stade 3, 36

L4: Larve stade 4, 36

L5: Larve stade 5, 36

LI: liver ou foie, 31, 128

lsrRNA: large subunit ribosomal ribonucleic acid, 106

MADT: Mer Adriatique, 51

MBA: Mer Baltique, 51

MDJ: Mer du Japon, 51

MDL: Mer de Ligurie, 51

MDN: Mer du Nord, 51

MDP: Mer du Portugal, 51

MEG: Mer Egée, 51

MJ: Mer Jaune, 51

MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis, 105

MMD: Mer Méditerranée, 51

MO: mouth ou bouche, 31, 128

MTN: Mer Tyrrhénienne, 51

NC: Nucleobond Column AXG kit

NCBI: National Center for Biotechnology Information, 133

ND: Non indiqué, 51

OMMD: Ouest de la Mer Méditerranée, 51

OR: odds ratio, 246

P vrais: test du rapport de vraisemblance, 246

P Wald: P value de Wald test, 246

P. sp.: *Pseudoterranova* sp., 51, 323

PC: Phenol-Chloroform method

PCF: Océan Pacifique, 51

PCFN: Océan Pacifique du Nord, 51

PCR: Polymerase Chain Reaction, 106

PCR-RFLP: PCR-restriction fragment length polymorphism, 107

PCR-SSCP: PCR-single strand conformational polymorphism, 107

Pd: *P. decipiens*, 51, 323

PDC: Péninsule de Corée, 51

PEGASE *Plateforme d'Expertises Génomiques Appliquées aux Science Expérimentales*

PFI: Plate-forme d'Innovations nouvelles vagues, 98

PMSI: programme de médicalisation des systèmes d'information, 82

PNNS: Programme National Nutrition santé, 84

QG: Qiagen Genomic-tip kit

SNOAPAD: Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases, 72

ssrRNA: small subunit ribosomal ribonucleic acid, 106

ST: sous type, 265; stomach ou estomac, 31, 128

Th1: T helper 1; lymphocytes auxiliaires, 74

TH2: T helper; lymphocytes auxiliaires, 73

TN-LB: Terre-Neuve-Labrador, 51

UMR *Unité Mixte de Recherche*

WG: Wizard Genomic DNA purification kit

Lexique

Echantillon (séquençage *HTS*) : nombre total de nématode(s) de tous types confondus isolé(s) d'une localisation corporelle de poisson et dont l'ADN a été extrait en mélange = 1 échantillon

Echantillon (*Sanger*) : Nématode présent dans une localisation corporelle de poisson(s) ayant subi une extraction d'ADN individuelle.

Index : Système d'identification utilisé en *HTS* pour reconnaître les parasites provenant d'une partie de poisson. 1 index = 1 échantillon et permet de reconnaître que les séquences des nématodes portant le même index proviennent d'une même localisation corporelle du poisson

Librairie de l'étude : Préparation d'un fragment d'ADN cible (*COX2*) au sein d'un échantillon et ligation aux index *Ionexpress barcoding* à l'issue d'une *PCR* en point finale ; une librairie représente, dans notre étude, 96 index.

Localisation corporelle du poisson : le terme localisation corporelle du poisson est utilisé au lieu d'organe. Ceci s'explique par le fait que la cavité corporelle n'est pas un organe. Les localisations corporelles correspondent à : FI : filets, CC : cavité corporelle, LI : foie, BO : intestin, ST : estomac, GO : gonades, OC : bouche, GI : branchies et BS : surface corporelle.

Mélange équimolaire : mélange des 96 produits *PCR* de l'échantillon de la librairie en quantités équimolaires d'ADN.

Pipeline : Notion informatique correspondant à l'enchaînement coordonné d'étapes informatiques élémentaires : les données produites en sortie de l'étape *n* (*output*) deviennent les données alimentant (*input*) l'étape *n+1*.

Reads : succession de nucléotides lus le long d'un fragment d'ADN matrice par le séquenceur (séquences d'ADN obtenues après la réalisation du séquençage à haut-débit)

Run : réalisation du séquençage à haut-débit

Workflow : Enchaînement d'étapes (informatique, biologique, administrative) en vue de réaliser une tâche précise.

Introduction

Le poisson est un mets de plus en plus consommé dans le monde. Il possède des qualités nutritionnelles précieuses qui en font un aliment particulièrement intéressant. Le poisson est, autant que la viande, une excellente source de protéines. Il contient également des minéraux, des oligo-éléments, des vitamines ainsi que des oméga 3 présents dans les poissons gras. C'est une véritable source de nutriments. C'est d'ailleurs pour ces raisons que l'Agence de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail conseille de consommer du poisson au moins deux fois par semaine (Anses, 2013). La consommation moyenne de poisson de la population française est estimée à 23,6 kg/personne/an en 2014 (FranceAgriMer, 2015).

A ce jour, la consommation de poissons crus est de plus en plus développée à l'échelle mondiale et cette tendance est également constatée en France. Manger du poisson cru n'est pourtant pas anodin, la suppression de l'étape de cuisson induit l'émergence de risques pour les consommateurs. En effet, les poissons sont susceptibles de contenir des parasites dont ceux de la famille des Anisakidae. Si la chair du poisson est bonne pour la santé, elle peut également être contaminée par des polluants, des microorganismes pathogènes ou des parasites.

Les parasites sont des organismes naturellement présents dans les poissons de toutes les espèces capturées sous toutes les latitudes du globe. Particulièrement, les Anisakidae circulent dans l'écosystème marin en utilisant les mammifères marins, les oiseaux ou les poissons comme hôte définitif. Par sa consommation de poissons crus, peu cuits ou insuffisamment transformés, l'Homme intervient en tant qu'hôte accidentel. Néanmoins les Anisakidae ainsi ingérés ne peuvent atteindre le stade adulte chez l'humain.

Ces vers visibles à l'œil nu dans le poisson, que l'Homme est susceptible de consommer, peuvent engendrer des pertes économiques pour la filière des produits de la pêche, provoquer un rejet de la part du consommateur, ou pourrait induire des pathologies chez l'Homme pour certains nématodes. Malgré des dispositifs de contrôle qualité importants, en cas de présence de parasite dans la chair, il n'est pas facile pour les entreprises qui préparent le poisson d'ôter tous les parasites des produits destinés à la consommation humaine.

En effet, parmi les parasites de poisson, les Ascaridoidea de la famille des Anisakidae sont des parasites pathogènes pour l'Homme. *Anisakis* spp. a été décrit chez plus de 200 espèces de poissons et 25 céphalopodes. *Pseudoterranova* a été décrit chez plus de 75 espèces de poissons. Le genre *Contracaecum* spp. est présent chez 12 espèces de poissons et peut également induire des problèmes de santé publique mais cela reste très rare. *Hysterothylacium* spp, quant à lui, est observé chez 12 espèces et est très présent dans la lumière intestinale. Il ne cause aucun problème de santé publique puisqu'il est détruit à une température de 37 °C. Cependant, comme pour les autres genres, sa présence dans le poisson peut provoquer un rejet de la part du consommateur.

Parmi ces nématodes, *A. simplex* et *Pseudoterranova* tel que *P. decipiens* pourraient induire une maladie digestive nommée Anisakidose qui se traduit par des formes gastrique ou intestinale soit aiguë soit chronique après quelques heures à plusieurs jours voire des mois ou des années après l'infestation. *Anisakis simplex* peut également induire des problèmes allergiques. De plus certains

allergènes d'*A. simplex* sont thermostables, ce qui engendre une augmentation du risque allergique pour les consommateurs. L'allergie peut se traduire par de l'urticaire, un prurit, un angioedème, un bronchospasme ou plus rarement, un choc anaphylactique.

Dans le monde, 20 000 cas d'Anisakidose, dont 95 % au Japon, ont été rapportés au cours de ces trente dernières années. L'Anisakidose représente environ 2 000 cas par an au Japon, 50 aux Etats-Unis et 500 en Europe dont plus de 95% sont rapportés aux Pays-Bas, en Allemagne, en France et en Espagne. En France, l'Anisakidose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. L'Institut de veille sanitaire (InVS), a estimé le nombre de cas à 8 par an mais ce nombre est sous-estimé. En effet, la grande variété des symptômes pouvant être rencontrés rend difficile l'identification de cette maladie. L'avis de l'EFSA de 2010 sur les parasites dans les produits de la pêche montre qu'au cours de ces 30 dernières années, le nombre de cas humains a augmenté. Ceci peut être dû à l'application de nouvelles techniques de détection des nématodes, plus efficaces, telles que l'endoscopie mais aussi, à la modification des habitudes alimentaires.

Il existe des données de prévalence dans le monde mais elles sont présentées de façon non standardisées et donc difficile à comparer. A ce jour, peu de données de prévalence de ces parasites dans les poissons existent en France. Ceci a initié le programme ANR *Fish-Parasites* (<http://fish-parasites.com>). Ce programme, financé par l'ANR depuis décembre 2010 (ANR-10-ALIA-004), avait pour but d'évaluer les risques liés à la consommation de produits de la pêche. Ce travail pluridisciplinaire incluait l'identification des parasites détectés dans les espèces de poissons d'eau de mer et d'eau douce les plus consommées en France, l'exploration du rôle potentiellement structurant de différents facteurs sur les populations parasitaires, l'apport de stratégies de détection en ligne des parasites dans les filets de poissons, la mise en place d'une plateforme scientifique d'identification des parasites du poisson et le développement d'un programme de formation continue à destination des professionnels de la filière pêche.

Ce sujet de thèse s'intègre dans ce programme ANR avec pour but l'acquisition et la structuration de données de prévalence des parasites potentiellement pathogènes pour l'Homme, présents dans les produits de la pêche couramment consommés en France en développant un outil d'identification en masse d'Anisakidae par séquençage à haut-débit en utilisant un *locus* du gène mitochondrial *COX2* comme base de discrimination. Quatre genres appartenant aux Anisakidae ont été étudiés plus précisément au cours de ce travail: *Anisakis* spp., *Pseudoterranova* spp., *Contracaecum* spp. et *Hysterothylacium* spp.

Etude bibliographique

I. Taxonomie et cycle biologique des Anisakidae

La taxonomie des Anisakidae est la suivante : (Hartwich, 1974) :

Phylum : Nématodes

Ordre : Ascaridida

Superfamille : Ascaridoidea, Baird, 1853

Famille : Anisakidae Skrjabin & Karokhin, 1945

Sous-famille : Anisakinae Chabaud, 1965

Tribu : Anisakinea, Chabaud, 1965

Genres : *Anisakis*, Dujardin, 1845

Pseudoterranova, Mozgovoï, 1951

Tribu : Contracaecinea, Mozgovoï & Shakhmatova, 1971

Genres : *Contracaecum*, Railliet & Henry, 1912

Phocascaris, Höst, 1932

Sous-famille : Raphidascaridinae, Hartwich, 1954

Genres : *Hysterothylacium*, Ward & Magath, 1917

Raphidascaris, Railliet & Henry, 1915

Figure 1 : Taxonomie des Anisakidae selon Hartwich (1974).

Ce classement des Anisakidae dans la Figure 1 est basé sur des critères de morphologie des systèmes excréteur et digestif et l'organe sexuel (spicule). En effet, cette méthode de classification est très utilisée chez les nématodes adultes (Mattiucci et Nascetti, 2008). Actuellement, deux classifications sont en vigueur, celle utilisée dans la présente étude et décrite ci-dessus avec la famille des Anisakidae regroupant les genres *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, *Phocascaris*, *Raphidascaris* et *Hysterothylacium* (Hartwich, 1974) et celle décrite dans le World Register of Marine Species (WoRMS Editorial Board, 2015).

Les Anisakidae ont un cycle biologique hétéroxène. Cela veut dire que leur évolution passe par au moins deux hôtes d'espèce différente pour accomplir leur cycle biologique (Audicana et Kennedy, 2008). Les adultes sont présents dans le tube digestif de pinnipèdes (*Pseudoterranova*,

Contracaecum), de cétacés (*Anisakis*), d'oiseaux de mer piscivores (*Contracaecum*) ou de poissons (*Hysterothylacium*).

Les œufs non embryonnés des Anisakidae sont excrétés avec les matières fécales de l'hôte définitif dans le milieu marin. Les larves de stades L1 et L2 sont présentes dans l'œuf mais le nombre de mues ayant lieu dans l'œuf ne fait pas consensus. Néanmoins, plusieurs études montrent que l'éclosion des œufs permet la libération de larves de stade L3 qui sont libres dans le milieu marin (Audicana et Kennedy, 2008 ; Efsa, 2010). Pour certains genres, la larve peut être ingérée directement par l'hôte définitif mais ceci est très rare (Stoskopf, 1993). La larve L3 libre est plus souvent ingérée par des crustacés, hôtes intermédiaires, comme les copépodes, amphipodes ou le krill. La larve parasite l'hémocoèle des crustacés. Les poissons et les céphalopodes interviennent ensuite comme hôtes de transport (paraténique) en se nourrissant des crustacés infectés. Si un poisson ou un mollusque porteur de larves L3 est ingéré par un autre poisson prédateur qui n'est pas l'hôte définitif, les capsules qui contiennent les larves d'Anisakidae sont digérées et la larve s'enkyste à nouveau dans ce nouvel hôte qui joue à son tour le rôle d'hôte paraténique. Ce dernier point est important d'un point de vue épidémiologique et de sécurité des aliments puisque les larves peuvent ainsi être transférées d'un poisson à un autre entraînant une accumulation de ces parasites tout au long de la chaîne alimentaire. Certains Anisakidae migrent du tube digestif vers la cavité corporelle et atteignent les différents organes. Les hôtes définitifs sont des mammifères marins ou des oiseaux piscivores ou des poissons prédateurs dans lesquels la larve L3, après avoir été ingérée, évolue en L4, L5 puis atteint l'âge adulte et sa maturité sexuelle. Chez l'hôte définitif, dans le cas où la larve n'évolue pas vers le stade adulte, elle peut provoquer des granulomes éosinophiles définitifs par exemple chez la baleine boréale (*Balaena mysticetus*) (Migaki *et al.*, 1982).

1.1. Le genre *Anisakis*

Le genre *Anisakis* a été créé en 1845 par Dujardin comme sous-genre du genre *Ascaris* (Linné, 1758). Le nom *Anisakis* est basé sur *anis-* (préfixe grec pour différent) et *akis* (grec pour épine ou spicule, Dujardin, 1845). Les vers appartenant au genre *Anisakis* sont habituellement retrouvés chez le hareng, hôte paraténique, et la baleine, hôte définitif. Ils sont donc communément appelés ver du hareng (*herringworm*) ou ver de la baleine (*whaleworm*). La larve L3 présente dans le poisson (Figure 2) peut mesurer de 9 à 39 mm de long. De couleur blanchâtre, elle peut être enroulée enkystée (Smith et Wootten, 1984a) comme le montre la Figure 2 A. La plupart des larves L3 se trouvent dans la cavité corporelle, sur le foie et sur la paroi du tube digestif et plus rarement, dans la chair des poissons.



Figure 2 : Morphologie macroscopique d'*Anisakis* spp.

Larve de stade 3 sous forme enkystée (A) chez le brosme (*Brosme brosme*), ou déenkystée (B) isolée du merlan (*Merlangius merlangus*). Les larves enkystées peuvent aussi s'aggréger en grappe sur la paroi externe de l'estomac dans la cavité viscérale de la lingue bleue (*Molva dypterygia*) (C).

La Figure 3 illustre le cycle biologique d'*A. simplex*. Les mammifères marins excrètent leurs fèces contenant les œufs d'*A. simplex* non embryonnés dans le milieu marin. Selon Hafsteinsson et Rizvi cité dans la thèse d'Augry (2012), la femelle d'*A. simplex* peut pondre de 200 000 à 500 000 œufs par jour (Hafsteinsson et Rizvi, 1987). Les larves de stade L1, L2 et L3 ont mûri dans l'œuf avant l'éclosion en larve L3 libre dans le milieu marin. Une expérience faite sur les œufs d'*A. simplex* récupérés à partir de fèces de dauphin à nez blanc (*Lagenorhynchus albirostris*) a montré que les œufs ont éclos à des températures supérieures à - 0,7°C. La rapidité de l'éclosion de la larve dépend de la température de l'eau. Cela peut prendre 5 jours à 24,3 °C ou bien 55 à 72 jours à 3,8°C. Plus la température est chaude, plus l'éclosion est rapide (Bratney et Clark, 1992). La larve L3 peut être ingérée par les hôtes intermédiaires crustacés tels que des copépodes et des euphausiacés (krill) ou directement par l'hôte définitif. Les hôtes paraténiques de premier niveau pourrait être les céphalopodes. Ceux-ci peuvent être soit directement ingérés par des mammifères marins soit par des poissons marins, hôtes paraténiques de deuxième niveau. Les parasites peuvent s'accumuler chez les poissons qui sont finalement ingérés par les mammifères marins. Dans une étude sur les *A. simplex* dans le nord de la mer du Nord (Mer de Norvège), le copépode *Paraeuchaeta norvegica* est un premier hôte intermédiaire obligatoire pour *A. simplex* (stade L3 uniquement) et les brosius améthyses (*Maurolicus muelleri*) sont les premiers hôtes paraténiques poisson obligatoire avant d'être ingéré par le lieu noir (*Pollachius virens*) (Klimpel *et al.*, 2004).

Après avoir atteint l'hôte définitif, la larve L3 évolue en L4, L5 et devient adulte. Le ver atteint alors sa maturité sexuelle, se reproduit, pond des œufs complétant ainsi le cycle.

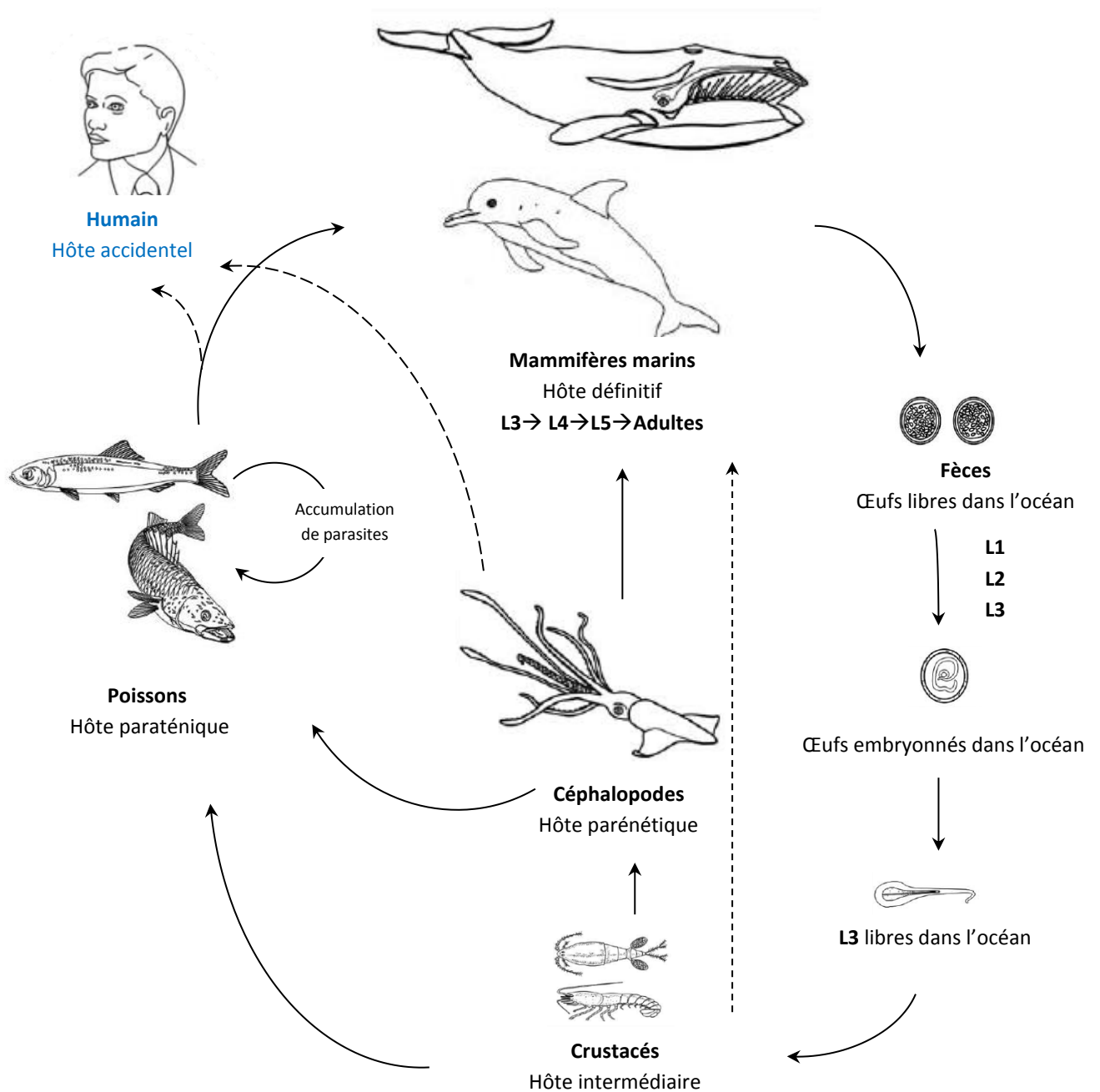


Figure 3 : Cycle biologique d'*A. simplex* (Audicana et Kennedy, 2008).

Le cycle commence par l'excrétion des œufs non embryonnés avec les matières fécales de l'hôte définitif. Les hôtes intermédiaires Crustacés et hôtes paraténiques Céphalopodes peuvent être ingérés directement par l'hôte définitif sans avoir été ingérés par les poissons. L'homme intervient en tant qu'hôte accidentel en consommant des produits de la pêche, crus ou insuffisamment cuits. L1, L2, L3, L4, L5 : larves de stades 1, 2, 3, 4, 5. Le trait en petit pointillé : ingestion directement dès le premier niveau d'hôte intermédiaire ou paraténique, les traits pointillés longs : ingestion par l'hôte accidentel. Trait plein : cycle le plus fréquent.

I.2. Le genre *Pseudoterranova*

Les vers appartenant au genre *Pseudoterranova* sont également appelés vers du cabillaud (*codworm*) ou ver du phoque (*sealworm*). La larve L3 se trouve dans les poissons et mesure de 9 à 58 mm de long. Sa couleur est blanc-crème, jaune-brun ou brun-rouge. La forme enkystée est irrégulière (Figure 4). La larve L3 se trouve habituellement dans la chair de poisson et plus rarement dans la cavité viscérale (Smith et Wootten, 1984b).

Après l'éclosion, la larve L3 est libre puis se fixe au substrat (Figure 5). Cette larve L3 peut être directement ingérée par l'hôte définitif, un mammifère marin. La larve L3 peut être également ingérée par des copépodes benthiques, puis des poissons et ensuite par l'hôte définitif. Elle peut aussi être ingérée par des copépodes benthiques, qui sont eux-mêmes ingérés par des Crustacés ou des Annélides polychètes ou des Mollusques (Stoskopf, 1993). Ces hôtes intermédiaires sont ensuite ingérés par des poissons benthiques qui sont les proies des poissons piscivores. Ceux-ci sont ensuite mangés par les hôtes définitifs, les mammifères marins. L'homme intervient en tant qu'hôte accidentel dans ce cycle (Stoskopf, 1993).



Figure 4 : Morphologie macroscopique de *Pseudoterranova* spp. Larve de stade L3 sous forme enkystée (A), ou déenkystée issue du brosmes (*Brosme brosme*, B). De nombreux parasites sous forme enkystée et déenkystée sont présents dans la chair (flanc) d'un cabillaud (*Gadus morhua*, c).

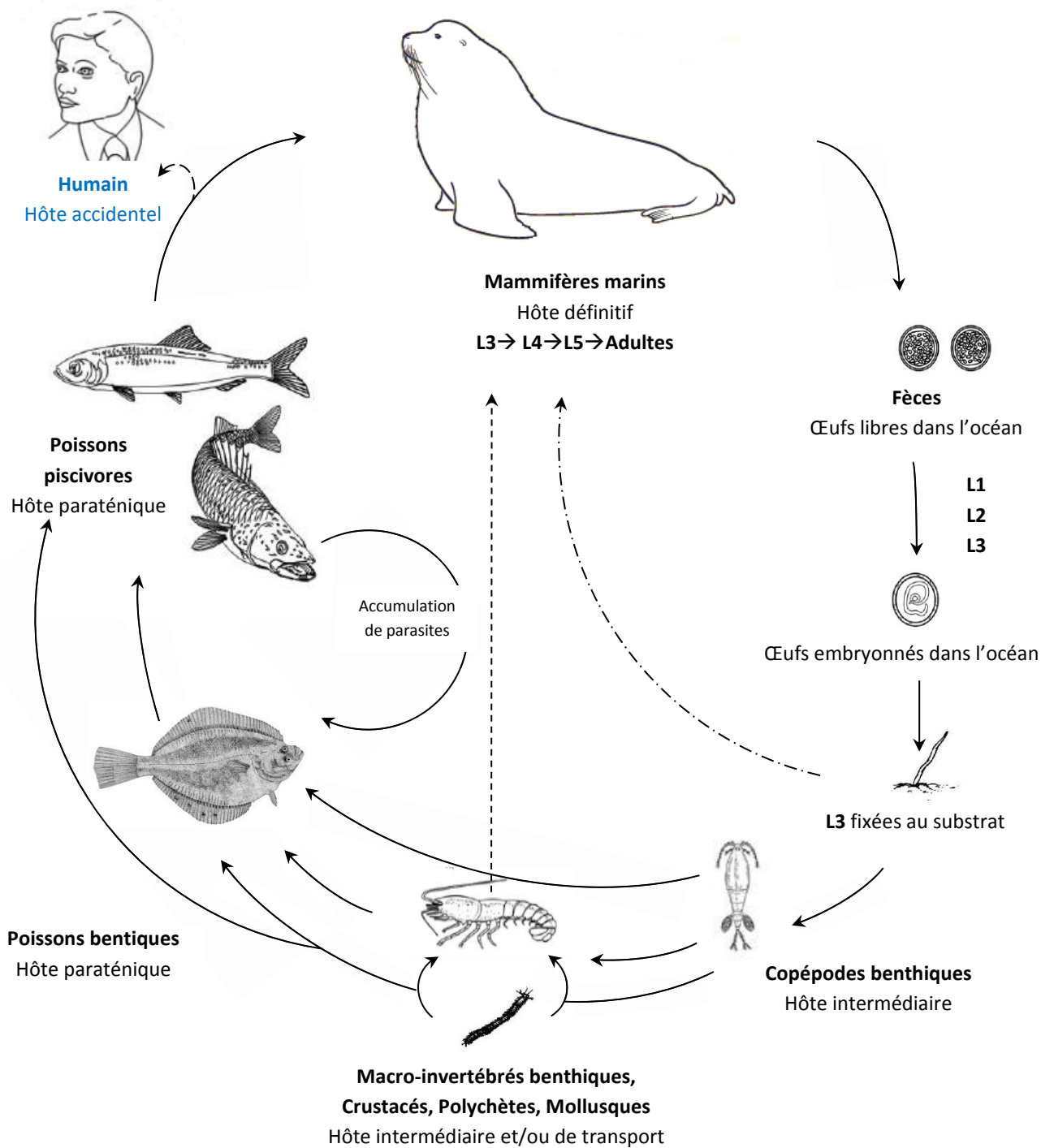


Figure 5 : Cycle biologique de *Pseudoterranova decipiens* selon Stoskopf (1993).

Les œufs non embryonnés sont excrétés avec les matières fécales par l'hôte définitif. La larve L3 peut-être ingérée directement par l'hôte définitif (trait long avec point) ; trait pointillé court : l'hôte intermédiaire peut être ingéré directement par l'hôte définitif, trait pointillé long : hôte accidentel, trait plein : cycle le plus fréquent. Plusieurs hôtes intermédiaires et paraténiques sont parasités par la larve L3 libre permettant à l'hôte définitif d'acquérir le parasite après ingestion. L'Homme intervient en tant qu'hôte accidentel en consommant les produits de la pêche, crus, peu cuits ou insuffisamment transformés. L1, L2, L3, L4, L5 : larves de stade 1, 2, 3, 4, 5.

I.3. Le genre *Contracaecum*

Les vers appartenant au genre *Contracaecum* spp. sont de couleur blanc-verdâtre et parfois teintés de rouge. La larve L3 présente dans les poissons mesure de 7 à 30 mm de long (Figure 6 A). La larve L3 se trouve habituellement sur la surface du foie des poissons (Smith, 1984) (Figure 6 B).

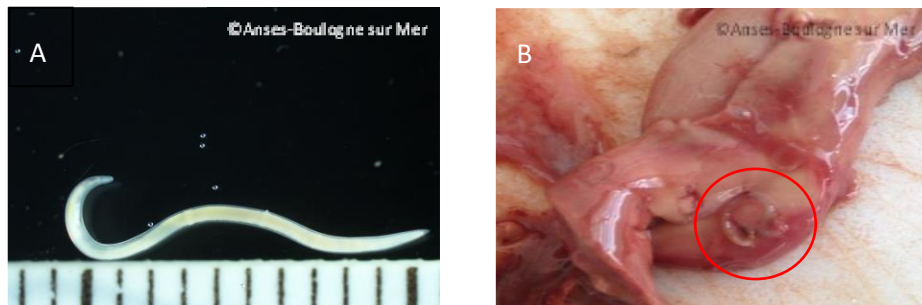


Figure 6 : Morphologie macroscopique de *Contracaecum* spp. (13 mm)

Larve L3 extraite d'un foie de merlan (*Merlangius merlangus*) et prise sous loupe binoculaire, 13 mm (A). Une larve L3 du genre *Contracaecum* *in situ* sur le foie d'un merlan (B).

Le cycle biologique des nématodes appartenant au genre *Contracaecum* (Figure 7) débute par l'excrétion des œufs non embryonnés avec les fèces des hôtes définitifs dans le milieu marin. Les œufs se développent ensuite en larves de stades L1, L2, L3 puis éclosent pour atteindre le stade L3 libre. Cette larve L3 peut être directement ingérée par l'hôte définitif ou être ingérée par des petits poissons, qui sont eux-mêmes ingérés par l'hôte définitif sans passer par les poissons de grande taille. Le cycle peut aussi être plus complexe en passant par des Crustacés ou des larves d'insectes qui sont à leur tour ingérés par plusieurs d'espèces de poisson prédateur de taille différente. Les hôtes définitifs relèvent de deux catégories : les pinnipèdes et les oiseaux piscivores selon l'espèce de *Contracaecum* (Køie et Fagerholm, 1995).

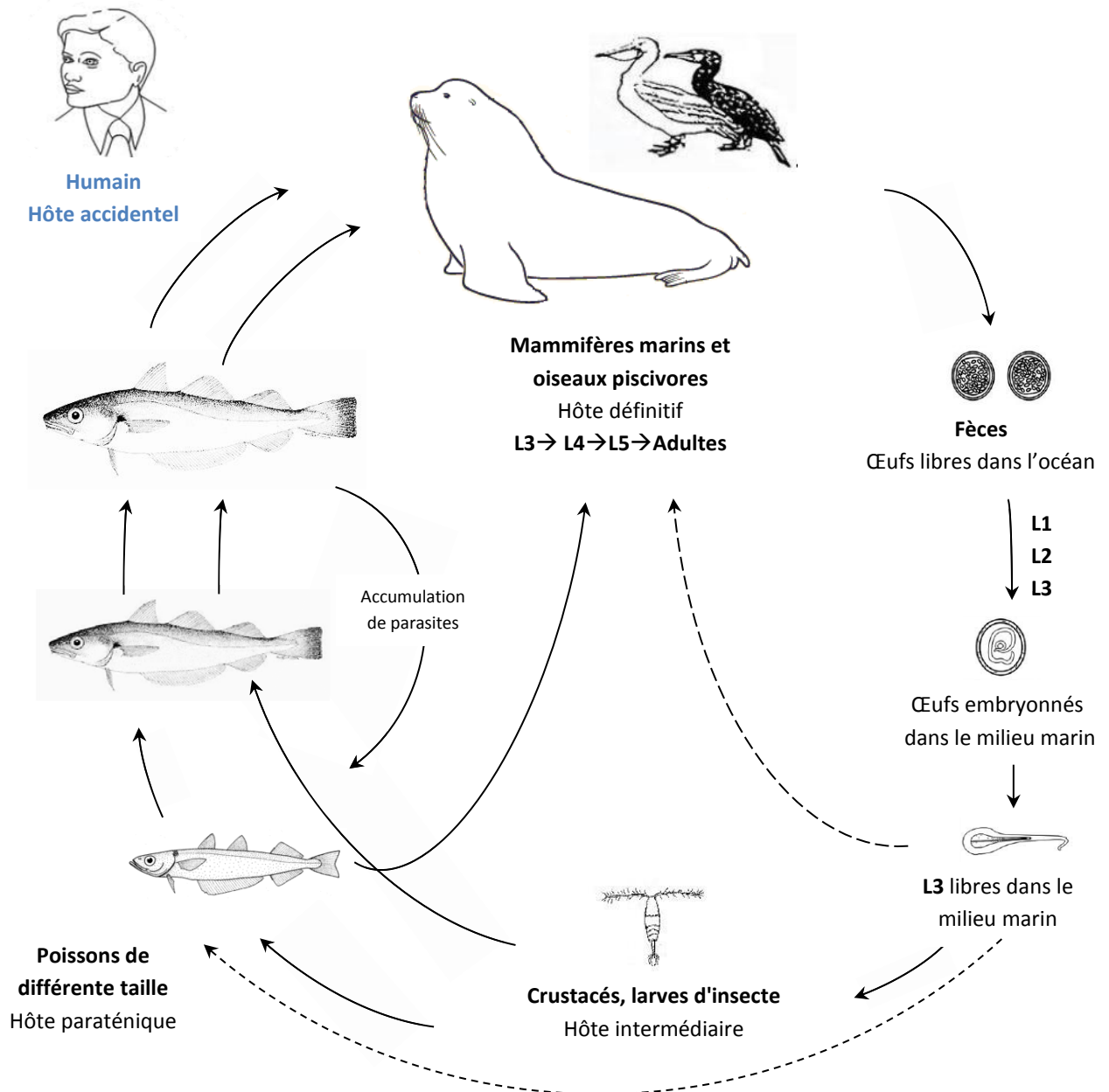


Figure 7 : Cycle biologique de *Contracaecum osculatum* selon Kjøie et Fagerholm (1995).

Les œufs non embryonnés sont excrétés avec les matières fécales de l'hôte définitif. Plusieurs hôtes intermédiaires et hôtes paraténeques sont parasités par la larve L3 ce qui permet, après ingestion, l'acquisition du parasite par les hôtes définitifs. L'homme intervient en tant qu'hôte accidentel en consommant les poissons, crus, peu cuits ou insuffisamment cuits. L1, L2, L3, L4, L5 : larves de stades 1, 2, 3, 4, 5. Trait pointillé long : larve ingérée directement par l'hôte définitif, trait avec les petits pointillés : larve ingérée directement par l'hôte paraténeque, Trait plein : cycle le plus fréquent.

1.4. Le genre *Hysterothylacium*

Les vers appartenant au genre *Hysterothylacium* spp. sont des Anisakidae dont la larve est de couleur blanchâtre à grise et très active. La larve mesure entre 1,5 et 2,5 mm (Boireau *et al.*, 2002). La femelle peut atteindre 8 cm (Berland, 1991) (Figure 8). Leurs hôtes définitifs sont des poissons, un même individu pouvant héberger des formes larvaires et adultes. Les *Hysterothylacium* n'induisent

pas de problème en santé humaine puisqu'ils sont tués à basse température. Ils sont très actifs à 10°C mais ils meurent à 30°C. La survie de ces larves nécessite une température basse (Huang, 1988).

De plus, les vers du genre *Hysterothylacium* ne sont pas de vrais parasites ; ils entretiennent plutôt des relations de mutualisme avec leur hôte puisqu'ils sont capables de décomposer les aliments ingérés par leurs hôtes ce qui permet l'accélération de la digestion (Berland, 1991 ; Berland, 1980). Plusieurs études ont montré que leur organe cible est le tube digestif. Le genre *Hysterothylacium* a été décrit une fois comme pouvant être pathogène pour l'homme et plus tard, cette hypothèse a été rejetée lorsqu'il a été montré que ces nématodes ne pouvaient pas pénétrer dans la muqueuse de l'intestin animal et qu'ils ne pouvaient pas survivre à une température de 37°C (Huang, 1988 ; Miliotis et Bier, 2003). De plus, une expérience d'introduction de larves d'*Hysterothylacium* de façon artificielle par voie orale et par la cavité péritonéale sur modèle murin a montrée la mort de l'ensemble des parasites contrairement aux larves d'*A. simplex* qui restent très actives dans le même modèle animal (Huang, 1988). En revanche, certaines études ont montré que *H. aduncum* a été retrouvé dans la chair d'anchois (*Engraulis encrasicolus*) de la mer Tyrrhénienne au large de l'Italie, ainsi que dans les viscères et les muscles de sardines (*Sardina pilchardus*). *Hysterothylacium aduncum* dans cette étude a été identifié par méthode moléculaire (Liberato *et al.*, 2013).

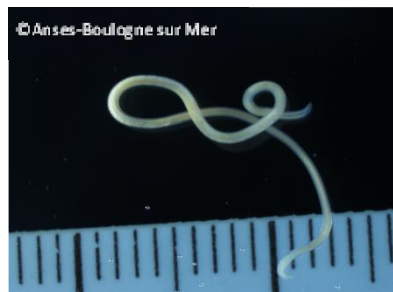


Figure 8 : *Hysterothylacium* spp. extrait de la lumière de l'estomac d'un cabillaud (*Gadus morhua*).

Les œufs d'*Hysterothylacium* sont excrétés dans le milieu marin de la même façon que les 3 autres Anisakidae déjà mentionnés, c'est-à-dire avec les fèces des hôtes définitifs. Les Crustacés planctoniques jouent le rôle d'hôtes intermédiaires. Les Crustacés Amphipodes Hypéridés sont les hôtes intermédiaires obligatoires de *H. aduncum* (Klimpel et Rückert, 2005). Les Cnidaires, les Annélides, les Crustacés et d'autres invertébrés sont des hôtes paraténiques de premier niveau. Les Crustacés planctoniques peuvent être mangés directement par l'hôte définitif. Le cycle peut être plus complexe en passant par tous les niveaux d'hôtes pour enfin atteindre l'hôte définitif (Køie, 1993) (Figure 9). En plus de sa présence dans les écosystèmes marins, *Hysterothylacium* a également été

retrouvé dans les milieux d'eau douce. Il a été décrit que le bivalve *Diplodon suavidicus* de la rivière Aripuana du Brésil est un hôte intermédiaire pour *Hysterothylacium* (Lopes et al., 2011).

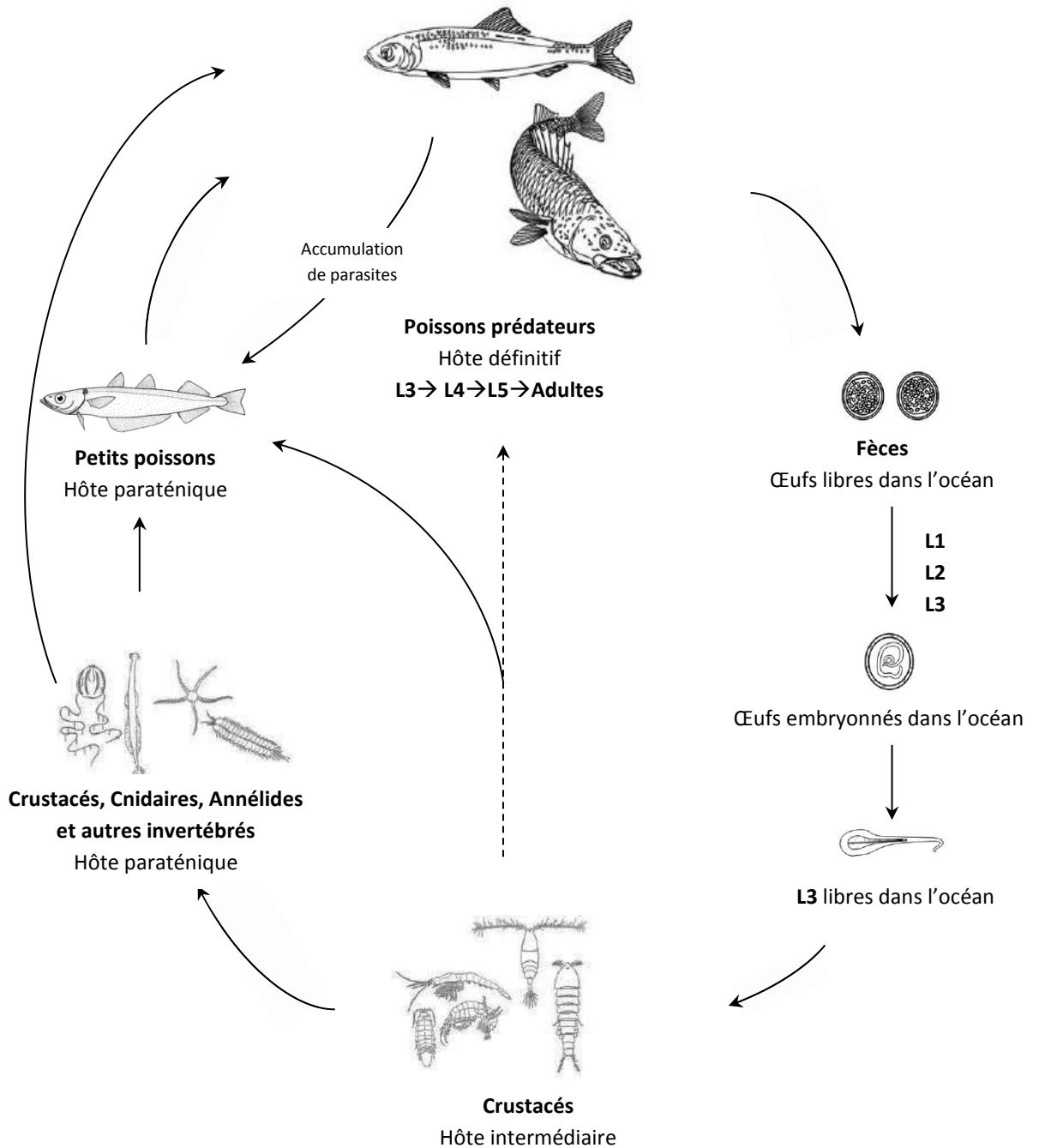


Figure 9 : Cycle biologique d'*Hysterothylacium aduncum* selon Kjøie (1993).

Le cycle commence par l'excrétion des œufs non embryonnés avec les matières fécales de l'hôte définitif, un poisson prédateur. Plusieurs hôtes intermédiaires et paraténiques peuvent être parasités par la larve L3 permettant ainsi, après avoir été ingérés, l'acquisition du parasite par l'hôte définitif. L1, L2, L3, L4, L5 : larves de stades 1, 2, 3, 4, 5. Ligne pointillée : l'hôte intermédiaire peut être ingéré directement par l'hôte définitif.

II. Distribution des Anisakidae dans les différents types d'hôtes et facteurs influençant leur distribution

Avant tout, plusieurs notions importantes sont à définir. La prévalence représente le nombre d'individu infestés par une même espèce de parasite (ou groupe taxonomique) sur le nombre total d'hôtes examinés pour l'espèce/groupe considéré. L'intensité moyenne du parasitisme représente le nombre total d'individus d'un taxon parasitaire divisé par le nombre total d'hôtes infectés. Et enfin, l'abondance représente le nombre de parasites divisé par le nombre total d'hôtes examinés (Angelucci *et al.*, 2011 ; Bush *et al.*, 1997).

II.1. Distribution des Anisakidae par espèce hôte

II.1.1. Hôte intermédiaire

Les hôtes intermédiaires des Anisakidae sont des Arthropodes benthiques tels que des crustacés comme les Euphausiacés (Klimpel *et al.*, 2004 ; Klimpel et Rückert, 2005 ; Smith et Wootten, 1978 ; Wootten *et al.*, 2010), les Isopodes, les Mysidacés et les Calanoida (Perdiguero-Alonso *et al.*, 2008), des Mollusques, d'autres membres du plancton benthique (Tableau I) (Audicana et Kennedy, 2008 ; Augry, 2012 ; Kjøie, 1993 ; Kjøie et Fagerholm, 1995), des Cnidaires, les Chaetognathes et les Annélides (Peoples, 2013 ; Perdiguero-Alonso *et al.*, 2008). Certains parasites ont un hôte intermédiaire obligatoire. Les Amphipodes (*Hyperiidæ* spp.) sont les hôtes intermédiaires obligatoires de *H. aduncum*. Les Décapodes (crevettes et crabes), par exemple, *Paraeuchaeta norvegica*, est hôte intermédiaire obligatoire d'*A. simplex*.

Tableau I : Hôtes intermédiaires des Anisakidae (mis à jour d'après Augry, 2012).

Embranchement	Classe	Ordre	Nom scientifique	Nom commun	Lieux de pêche	Espaces Anisakidae	Références	
Arthropodes	Malacostracés	Amphipodes	<i>Caprella septentrionalis</i>	/	Mer de Barents	<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978	
			<i>Hyperidae</i> spp.	/	océan Atlantique Nord, mer du Nord centrale	<i>H. aduncum</i> (obligatoire)	(Iimpel et Rückert, 2005)	
	Décapodes		<i>Paraeuchaeta norvegica</i>		océan Atlantique Nord, Sud-est de Norvège	<i>A. simplex</i> (obligatoire)	(Klímpel <i>et al.</i> , 2004)	
			<i>Hyas araneus</i>	Crabe araignée	Mer de Barents	<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978	
			<i>Pandalus borealis</i>	Crevette Nordique	Mer du Japon	<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978	
	Euphausiacés		<i>Pandalus kessleri</i>	Crevette Nordique	Mer d'Okhotsk (Pacifique)		<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978
			<i>Thysanoessa raschii</i>	Zooplancton, krill	Mer de Barents, mer de Béring, Pacifique Nord		<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978
			<i>Thysanoessa inermis</i>	Zooplancton, krill	océan Atlantique Nord, mer du Nord		<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978
			<i>Thysanoessa longicauda</i>	Zooplancton, krill	océan Atlantique Nord, mer du Nord		<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978
			<i>Thysanoessa longipes</i>	Zooplancton, krill	Mer de Béring, Pacifique Nord		<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978
<i>Meganyctiphanes norvegica</i>			Zooplancton, krill	océan Atlantique Nord, mer du Nord		<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978	
<i>Euphausia pacifica</i>			Zooplancton, krill	Mer de Béring, Pacifique Nord, mer de Chine		<i>A. simplex</i>	Smith et Wootten, 1978	
Cnidaires		<i>Isopodes</i>	/	océan Atlantique Nord-Est		<i>H. aduncum</i>	Perdiguero-Alonso <i>et al.</i> , 2008	
		<i>Mysidacés</i>	/	océan Atlantique Nord-Est		<i>H. aduncum</i>	Perdiguero-Alonso <i>et al.</i> , 2008	
Chaetognathes	Maxillopodes		<i>Acartia</i> spp.	/	océan Atlantique Nord-Est		<i>H. aduncum</i>	Perdiguero-Alonso <i>et al.</i> , 2008
				/	océan Atlantique Nord-Est		<i>H. aduncum</i>	Perdiguero-Alonso <i>et al.</i> , 2008
Annélides	Polychètes	Aciculata	<i>Lepidonotus squamatus</i>	/	océan Atlantique Nord-Est		<i>H. aduncum</i>	Perdiguero-Alonso <i>et al.</i> , 2008
			<i>Tomopteris helgolandica</i>	/	Mer Blanche (Russie)	<i>Anisakis</i> sp./ <i>H. aduncum</i>	Waite and Popova 1974	
			<i>Nereis pelagica</i>	/	Mer du Nord	<i>Contracecum</i> sp.	Reimer <i>et al.</i> , 1971 cité dans Peoples, 2013	
			<i>Gattyana cirrhosa</i>	/	Mer de Béring, Zeeland, Danemark	<i>H. aduncum</i>	Popova <i>et al.</i> , 1964, Valter, 1970 cité dans Peoples, 2013	
			<i>Harmothoe imbricata</i>	/	Non indiqué		<i>H. aduncum</i>	Køie, 1993 cité dans Peoples, 2013
				/	Non indiqué		<i>H. aduncum</i>	Peoples, 2013
			<i>polynoids non identifié</i>		Non indiqué		<i>H. aduncum</i>	Peoples, 2013

II.1.2. Hôte paraténique

L'hôte paraténique, également appelé hôte de transport, n'est pas nécessaire pour le développement du parasite mais permet de transmettre le parasite à un autre niveau d'hôte. Les parasites peuvent s'accumuler dans ce type d'hôte. Les hôtes paraténiques des Anisakidae peuvent être des céphalopodes ou des poissons de mer, d'eau saumâtre et également d'eau douce pour *Hysterothylacium* spp.

- Céphalopodes

Le Tableau II présente quelques exemples d'hôtes céphalopodes (sèches, calmars et pieuvres) hébergeant des Anisakidae (Abollo *et al.*, 2001 ; Abollo et Pascual, 2002 ; Angelucci *et al.*, 2011 ; Augry, 2012 ; Ma *et al.*, 1997 ; Pascual *et al.*, 1999 ; Petric *et al.*, 2011 ; Serracca *et al.*, 2013).

Tableau II : Exemple d'hôtes Céphalopodes hébergeant des Anisakidae (d'après Augry, 2012).

Famille	Nom latin	Lieu de pêche	Espèce parasite	Prévalence (%)	intensité moyenne	Références
Sepiidae (seiches)	<i>Sepia officinalis</i> (seiche commune)	Nord ouest Espagne	Complexe <i>A. simplex</i>	3,4	2	Abollo <i>et al.</i> , 2001
	<i>Sepia esculenta</i>	Mer Bohai (Chine)	<i>A. simplex</i>	15	-	Ma, Jiang <i>et al.</i> , 1997
Loliginidae (calmars)	<i>Alloteuthis (Loligo) subulata</i>	Nord ouest Espagne	Complexe <i>A. simplex</i>	-	-	Abollo <i>et al.</i> , 2001
Ommastrephidae (calmars)	<i>Todaropsis eblanae</i>	Nord ouest Espagne	Complexe <i>A. simplex</i>	23,5	7,3	Abollo <i>et al.</i> , 2001
		Nord ouest Espagne	Complexe <i>A. simplex</i>	34,2	7,5	Abollo <i>et al.</i> , 2001
		Nord ouest Espagne	Complexe <i>A. simplex</i>	11	1	Abollo <i>et al.</i> , 2002
	<i>Illex coindetii</i>	Sardaigne	(<i>Anisakis</i> larve de type II) <i>Anisakis</i> sp.	50	-	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
		Eaux de Galice	<i>A. simplex</i>	0 - 60	-	Pascual <i>et al.</i> , 1999
		Mer Adriatique	<i>A. pegreffii</i>	30,5	-	Petric <i>et al.</i> , 2011
		Mer de Ligurie	<i>Anisakis</i> sp., <i>Hysterothylacium</i> sp.	1,7	-	Serracca <i>et al.</i> , 2013
<i>Dosidicus gigas</i>	océan Pacifique	<i>A. simplex</i> , <i>A. physeteris</i> , <i>Porrocaecum</i> sp., <i>Contraecum</i> sp.	-	-	Shukhgalter et Nigmatullin, 2001 dans Augry, 2012	
Octopodidae (pieuvres)	<i>Octopus</i> spp.	Sardaigne	(<i>Anisakis</i> larve de type II) <i>Anisakis</i> sp., <i>Hysterothylacium</i> sp.	3,8	-	Angelucci <i>et al.</i> , 2011

La prévalence des parasites dans les hôtes intermédiaires listés dans le Tableau II est variable et fonction, entre autres, des espèces hôtes et de la zone géographique. Il manque souvent des informations quant à la prévalence et l'intensité du parasitisme dans certaines études. Les seiches

sont très peu à moyennement parasitées par *A. simplex* (3,4-15 %). Pour les calmars, la prévalence des parasites varie entre 0 et 70 %. Les calmars présentent des niveaux d'intensité de 1 à 7 parasites par individu. Un exemple parmi des calmars, la prévalence des Anisakidae chez *Illex condetti* est basse en mer de Ligurie et au Nord-ouest de l'Espagne mais cette espèce est très infestée dans une sous zone proche dans la même mer Méditerranée. C'est le cas de la mer de Sardaigne avec la présence d'*Anisakis* sp. et d'*A. simplex* (50 % de prévalence). Ceci montre la forte variabilité de prévalence des Anisakidae selon la localisation géographique au sein d'une même espèce hôte.

- Poisson

Les genres appartenant à la famille des Anisakidae surtout *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium* ont été mentionnés chez plusieurs espèces de poissons comestibles. *Anisakis* a été rapporté chez plus de 200 espèces de poissons et 25 céphalopodes. *Pseudoterranova* a été mentionné chez plus de 75 espèces de poissons (Abollo *et al.*, 2001 ; Angot, 1993 ; McClelland et Marcogliese, 1994). En analysant 100 articles publiés entre 1960 et 2015, un total de 210 espèces appartenant à 25 familles de poisson d'eau de mer (Annexe 6) ont été rapportées comme parasités par les Anisakidae (genre *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, *Hysterothylacium*, *Raphidascaris* et *Phocanema*). Plus de 90 % de ces espèces de poisson ont été parasités par des vers appartenant au genre *Anisakis*.

Cinquante-trois espèces de poissons marins de 16 familles ont été sélectionnées (par rapport à la fréquence de consommation et par rapport aux échantillons du programme *Fish-Parasites*) parmi les 210 espèces pour rapporter leur prévalence dans les quatre tableaux suivants (Tableau IIIa, Tableau IIIb, Tableau IIIc et Tableau IIId). Les autres espèces et les données plus détaillées sont présentées dans l'Annexe 6. Il est très difficile de comparer et de présenter de même façon les données issues de la littérature car chaque étude a présenté les résultats sous des formes différentes. Néanmoins, ces tableaux ont permis de montrer la prévalence des différentes espèces de poisson parasitées par les Anisakidae. Au sein d'une même espèce, les facteurs influençant l'infestation peuvent être les différentes zones de pêche, l'effectif, la saisonnalité, la nature de l'échantillon prélevé (filets, poisson éviscéré ou entier), l'état sauvage ou élevé et la méthode de détection des parasites. Ces tableaux ont permis d'avoir plutôt une vision globale des différences de prévalence chez des espèces de poissons au sein d'une même famille ou pour une même espèce de poisson consommées sur tout en France et en Europe (océan Atlantique Nord-Est). Il y a également certaines espèces qui ont été étudiées dans l'océan Pacifique. Ceci permet de voir la diversité des Anisakidae au sein d'une même famille ou d'une espèce de poisson.

Tableau IIIa: Prévalence des Anisakidae dans 53 espèces de poissons de mer
Cinquante-trois espèces appartenant à 16 familles, résultats issus de 72 études publiées entre 1960 et 2015. Les poissons
sont classés en fonction du niveau de prévalence des Anisakidae.

Famille	Nom commun	Nom latin	Prévalence (%)	Nombre d'études	Nb min-max de poisson chaque étude	Nombre total de poisson analysés	Zones de pêche	Espèces parasites	Références
100 % de Prévalence (valeur maximum)									
<i>Gadidae</i>	Merlan bleu	<i>Micromesistius poutassou</i>	10,63-100	10	4-345	1207	Atl NE, MMD, MEG	A. sp., Ap, As, As(ss), A. phys, As-Ap, Ha, H, sp., ND	2, 4, 11, 17, 33, 35, 38, 49, 53, 69
<i>Scoribridae</i>	Maquereau espagnol	<i>Scomber japonicus</i>	28,10-100	9	10-417	1521	Atl NE, MMD, MEG, MDJ, PDC, PCFN, ND	A. sp., Ap, As, As(ss), A. phys, As-Ap, At, Az, Ha, H, sp., Pd	1, 5, 11, 16, 25, 49, 68
<i>Merlucciidae</i>	Merlu commun	<i>Merluccius merluccius</i>	62-100	8	10-394	1097	Atl NE, MMD, EMMD, MEG, ODWMD, ND	A. sp., Ap, As, As(ss), A. phys, At, Az, Ab, Ha, H, sp., Pd, C sp.	2, 4, 11, 25, 41, 49
<i>Gadidae</i>	Cabillaud	<i>Gadus morhua</i>	0-100	11	11-12207	18857	Atl NE, MBA, Atl -NW, TN-LB	A. sp., As, Ha, Pd, P. sp., Co, C. sp. C. spp.	7, 13, 22, 25, 28, 37, 42, 51, 62, 63
<i>Scoribridae</i>	Maquereau commun	<i>Scomber scombrus</i>	0-100	8	6-447	849	Atl NE, MEG, MMD, ND	A. sp., Ap, As (ss), Ha, H, sp., C sp.	2, 4, 21, 33, 35, 48, 49, 53
<i>Carangidae</i>	Chinchard	<i>Trachurus trachurus</i>	2,60-100	7	32-360	854	Atl NE, MMD, MEG, MDL, ND	A. sp., Ap, As, As(ss), As-Ap, Ha, H, sp., Pd, C. sp.	2, 3, 11, 21, 25, 38, 58
<i>Gadidae</i>	Lieu noir	<i>Pollachius virens</i>	26,7-100	4	33-389	684	Atl NE, MDN	As, Pd, ND	13, 30, 51, 62
<i>Gadidae</i>	Merlan	<i>Merlangius merlangus</i>	15,4-100	4	26-402	715	Atl NE, MDN, ND	As, Ha, Pd, C. sp.	13, 25, 31, 51
<i>Pleuronectidae</i>	Flétan nain	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	0,44-100	3	160-28065	28473	Atl NE, Atl -NW	As, Pd, C. sp.	7, 9, 43
<i>Carangidae</i>	Chinchard bleu	<i>Trachurus picturatus</i>	62,5-100	2	40-70	110	Atl NE, MMD	As, Ap, As(ss), At, Az, A. phys	16, 38
<i>Salmonidae</i>	Saumon rouge	<i>Oncorhynchus nerka</i> *	40-100	2	10-50	60	DDP, PCF	A. sp., P. sp.	19, 46
<i>Salmonidae</i>	Saumon du Pacifique	<i>Oncorhynchus ke ta</i> *	39-100	2	120-194	314	PDC, PCFN	A. sp., A. spp.	26, 59
<i>Salmonidae</i>	Saumon atlantique	<i>Salmo salar</i> ***	0-100	6	50-1180	2935	Atl, Atl NE	A. sp, As, Pd, ND	32, 36, 40, 44, 70, 71
<i>Sparidae</i>	Dorade rose	<i>Pagellus bogaraveo</i>	36-100	2	34-269	303	Atl NE, MDP	Ap, As, A.sp., H. sp.	16, 23
<i>Congridae</i>	Congre	<i>Conger myriaster</i>	100	2	10-20	30	PDC, MJ	A. spp.	12
<i>Gadidae</i>	Eglefin	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	100	1	308	308	MDN	Ha	31
<i>Trichiuridae</i>	Sabre	<i>Trichiurus lepturus</i>	100	1	64	64	CRJ	A. sp., H. sp.	47

Tableau IIIb: Prévalence des Anisakidae dans 53 espèces de poissons de mer appartenant à 16 familles issue de 72 études publiées entre 1960 et 2015. Les poissons sont classés en fonction du niveau de prévalence des Anisakidae.

Famille	Nom commun	Nom latin	Prévalence (%)	Nombre d'études	Nb min-max de poisson de chaque étude	Nombre total de poisson analysés	Zone de pêche	Espèces parasites	Référence
<i>Gadidae</i>	Lingue Bleue	<i>Molva dypterygia</i>	100	1	25	25	Atl NE	As (ss)	2
<i>Lophiidae</i>	Baudroie	<i>Lophius piscatorius</i>	100	1	25	25	Atl NE	As (ss)	2
<i>Clupeidae</i>	Alose canadienne	<i>Alosa sapidissima</i>	100	1	12	12	PCF+Rivière	As	61
<i>Lophiidae</i>	Baudroie	<i>Lophius litulon</i>	100	1	10	10	MJ	As	72
<i>Salmonidae</i>	Truite	<i>Salmo trutta</i> **	100	1	5	5	Atl	As	71
60 à moins de 100 % de Prévalence (valeur maximum)									
<i>Clupeidae</i>	Hareng commun	<i>Clupea harengus</i>	7-97	10	46-31091	41963	Atl NE, Atl NE-MBA, ND	As, A. sp., Co, C. sp., Ha, Pd, Raphidascaris acus	10, 25, 27, 33, 34, 52, 57, 64, 65, 67
<i>Engraulidae</i>	Anchois	<i>Engraulis encrasicollis</i>	0-77	9	27-5697	9146	Atl NE+ MMD, MMD, Atl NE, MEG, MTN, MADT	As, Ap, A. sp., Ha, H. sp., C. sp., Pd	4, 11, 14, 18, 21, 25, 53, 56
<i>Moronidae</i>	Bar commun	<i>Dicentrarchus labrax</i>	65,27-89,36	3	259-561	1120	Atl NE, MMD, CEG	A. sp., ND	6, 45, 50
<i>Mullidae</i>	Rouget de roche	<i>Mullus surmuletus</i>	0-55,60	3	21-77	123	Atl NE, MMD	As, A. sp., H. sp.	2, 38, 53
<i>Gadidae</i>	Tacaud commun	<i>Trisopterus luscus</i>	32-84,49	2	25-139	164	Atl, Atl NE	A. sp., As(ss), H. sp.	2, 54
<i>Clupeidae</i>	Hareng du Pacifique	<i>Clupea pallasii</i>	40-88	2	15-127	142	PDC, PCF	A. sp., A. spp., P. sp.	12, 46
<i>Gadidae</i>	Lieu jaune	<i>Pollachius pollachius</i>	0-82,90	2	25-70	95	Atl NE	As, Pd	2, 51
<i>Clupeidae</i>	Pilchard de Californie	<i>Sardinops sagax</i>	90	1	10	10	GBA	H. sp.	60
<i>Gadidae</i>	Cabillaud/ morue du Pacifique	<i>Gadus macrocephalus</i>	84	1	509	509	PCF	A. sp., P. sp.	46
<i>Sparidae</i>	Dorade grise	<i>Spondyliosoma cantharus</i>	80	1	25	25	Atl NE	As(ss)	2
<i>Sebastidae</i>	Sébaste du Nord	<i>Sebastes mentella</i>	2-79	1	100	100	Atl NE	As, Ha	29
<i>Salmonidae</i>	Saumon japonais	<i>Oncorhynchus masoumasou</i> ***	72,7	1	11	11	Atl NE, MMD, MEG, PDC, MDJ, PCFN, ND	Ap, As, A. sp., As-Ap, As(ss), A. phys., At, Az, H. sp., Ha, Pd, C. sp.	12

Tableau IIIc: Prévalence des Anisakidae dans 53 espèces appartenant à 16 familles de poissons de mer étudiés dans les 72 études publiées entre 1960 et 2015. Les poissons sont classés en fonction du niveau de prévalence des Anisakidae.

Famille	Nom commun	Nom latin	Prévalence	Nombre d'études	Nb min-max de chaque étude	Nombre total poisson	Zone de pêche	Espèces parasites	Référence
60 à moins de 100 % de Prévalence (valeur maximum)									
<i>Gadidae</i>	Cabillaud/ morue polaire	<i>Boreogadus saida</i>	68,6	1	51	51	Atl NE	As, Pd	32
<i>Carangidae</i>	Chinchard à queue jaune	<i>Trachurus mediterraneus</i>	60	1	30	30	MMD	A. sp.	49
10 à moins de 60 % de prévalence (valeur maximum)									
<i>Sparidae</i>	Dorade royale	<i>Sparus aurata</i>	0-20	3	10-612	647	Atl NE, MMD	A. sp., ND	2, 4, 50
<i>Phycidae</i>	Loche	<i>Phycis bleinnoides</i>	53,75	1	272	272	MMD	As(s), A. phys, Ha, Hf	20
<i>Mullidae</i>	Rouget barbet	<i>Mullus barbatus</i>	5,55-41,60	4	12-223	320	MMD, MEG, MDL	As, A. sp., H. sp.	11, 38, 49, 58
<i>Salmonidae</i>	Ombre chevalier	<i>Salvelinus alpinus**</i>	18,2	1	22	22	Atl NE	As, Pd	32
<i>Salmonidae</i>	Saumon argenté	<i>Oncorhynchus kisutch****</i>	36	1	55	55	PCF	A. sp., P. sp.	46
<i>Congridae</i>	Congre	<i>Conger conger</i>	33,33	1	25	25	Atl NE	As (ss)	2
<i>Sparidae</i>	Pageot	<i>Pagellus erythrinus</i>	11,76-33,30	3	9-32	58	MDL, MMD, MEG	A. sp., H. sp., C. sp.	11, 53, 58
<i>Clupeidae</i>	Sardine commune	<i>Sardina pilchardus</i>	0-25	8	5-214	717	Atl NE, MMD, MEG, ND	As, A. sp., Ap, Ha, H. sp., C. sp., Pd	2, 4, 11, 21, 25, 53, 55
<i>Gadidae</i>	Capelan de Méditerranée	<i>Trisopterus minutus</i>	13,79	1	29	29	MMD	A. sp., C. sp.	53
0 à moins de 10 % de prévalence (valeur maximum)									
<i>Gadidae</i>	Lingue franche	<i>Molva molva</i>	8,9	1	79	79	Atl NE	As, Pd	51
<i>Gadidae</i>	Poulamon atlantique	<i>Microgadus tomcod</i>	7,7	1	26	26	Atl NE	As, Pd	32
<i>Lophidae</i>	Baudroie rousse	<i>Lophius budegassa</i>	5,56	1	36	36	MMD	A. sp., H. sp.	53
<i>Clupeidae</i>	Allache/ Sardinella ronde	<i>Sardinella aurita</i>	4	1	22	22	MEG	A. sp.	11
<i>Pleuronectidae</i>	Flet d'Europe	<i>Platichthys flesus</i>	3	1	34	34	Atl NE	As (ss), Ap, At, Hb, As-Ap	39
<i>Clupeidae</i>	Sprat	<i>Sprattus sprattus</i>	ND	1	840	840	Atl NE	A. sp., C. sp.	27
<i>Merlucciidae</i>	Merlu argentin	<i>Merluccius hubbi</i>	ND	1	42	42	GSM	A. sp., P. sp.	24

Tableaux IIIc: Abréviations des zones de pêche, des noms d'espèces d'Anisakidae et références bibliographiques utilisées dans les tableaux IIIa, IIIb et IIIc.

Zones de pêche et signe	Atl: océan Atlantique, Atl NE : océan Atlantique Nord-Est, Atl -NW: Nord-Ouest de l'Atlantique, CEG : Côte d'Egypte, CRJ : Côte de Rio de Janeiro, DDP : Détroit de Puget (Etats-Unis), EMMD : Est de mer Méditerranée, GBA : Grande baie Australienne, GSM : golfe de San Matias, MADT : mer Adriatique, MBA : mer Baltique, MDJ : mer de Japon, MDL : mer de Ligurie, MDN : mer du Nord, MDP : mer du Portugal, MEG : mer Egée, MJ : mer Jaune, MMD : mer méditerranée, MTN : mer Tyrrhénienne, ND : Non indiqué, OMMD : Ouest de mer Méditerranée, PCF : océan Pacifique, PCFN : océan Pacifique du Nord (Amérique du sud), PDC : Péninsule de Corée, TN-LB : Terre-Neuve-Labrador * : sauvage, ** : élevage, *** : élevage ouvert en mer, **** : achat du marché, ND : non déterminé
Espèces de parasites	As : <i>A. simplex</i> , As(ss) : <i>A. simplex(sensu stricto)</i> , A. sp. : <i>Anisakis</i> sp., As(sl) : <i>A. simplex</i> (sensu lato), As-Ap : <i>A. simplex</i> x <i>A. pegreffii</i> , Ab : <i>A. brevispiculata</i> , Aphys : <i>A. physeteris</i> , Az : <i>A. ziphidarum</i> , Ap : <i>A. pegreffii</i> , At : <i>A. typica</i> , C. sp. : <i>Contracaecum</i> sp., Co : <i>C. osculatum</i> , H. sp. : <i>Hysterothylacium</i> sp., Ha : <i>H. aduncum</i> , Hf : <i>H. fabri</i> , P. sp. : <i>Pseudoterranova</i> sp., Pd : <i>P. decipiens</i>
Références	1 : (Abattouy <i>et al.</i> , 2011), 2 : (Abollo <i>et al.</i> , 2001), 3 : (Adroher <i>et al.</i> , 1996), 4 : (Angelucci <i>et al.</i> , 2011), 5 : (Bak <i>et al.</i> , 2014), 6 : (Bernardi, 2009), 7 : (Boily et Marcogliese, 1995), 8 : (Bratley et Bishop, 1992), 9 : (Bristow et Berland, 1992), 10 : (CEVPM, 1993), 11 : (Chaligiannis <i>et al.</i> , 2012), 12 : (Cho <i>et al.</i> , 2012), 13 : (Chord-Auger <i>et al.</i> , 1995), 14 : (Ciccarelli <i>et al.</i> , 2011), 15 : (Costa <i>et al.</i> , 2004), 16 : (Costa <i>et al.</i> , 2003), 17 : (Cruz <i>et al.</i> , 2007), 18 : (Liberato <i>et al.</i> , 2013), 19 : (Deardorff et Kent, 1989), 20 : (Farjallah <i>et al.</i> , 2006), 21 : (Gutiérrez-Galindo <i>et al.</i> , 2010), 22 : (Hauksson <i>et al.</i> , 2012), 23 : (Hermida <i>et al.</i> , 2012), 24 : (Herreras <i>et al.</i> , 2000), 25 : (Huang, 1988), 26 : (Novotny et Uzman, 1960), 27 : (Khalil, 1969), 28 : (Khan et Chandra, 2006), 29 : (Klapper <i>et al.</i> , 2015), 30 : (Klimpel <i>et al.</i> , 2004), 31 : (Klimpel et Rückert, 2005), 32 : (Pufall <i>et al.</i> , 2012), 33 : (Levsen <i>et al.</i> , 2005), 34 : (Levsen et Lunestad, 2010), 35 : (Llarena-Reino <i>et al.</i> , 2012), 36 : (Lunestad, 2003), 37 : (Lunneryd <i>et al.</i> , 2015), 38 : (Manfredi <i>et al.</i> , 2000), 39 : (Marques <i>et al.</i> , 2006), 40 : (Marty, 2008), 41 : (Mattiucci <i>et al.</i> , 2004), 42 : (McClelland et Marcogliese, 1994), 43 : (McClelland <i>et al.</i> , 2000), 44 : (Mo <i>et al.</i> , 2014), 45 : (Morsy <i>et al.</i> , 2012), 46 : (Myers, 1979), 47 : (Borges <i>et al.</i> , 2012), 48 : (Pekmezci, 2014), 49 : (Pekmezci <i>et al.</i> , 2014), (Peñalver <i>et al.</i> , 2010), 51 : (Piccolo <i>et al.</i> , 1999), 52 : (Podolska et Horbowy, 2003), 53 : (Pulleiro-Potel <i>et al.</i> , 2015), 54 : (Rello <i>et al.</i> , 2008), 55 : (Rello <i>et al.</i> , 2008), 56 : (Rello <i>et al.</i> , 2009), 57 : (Roepstorff <i>et al.</i> , 1993), 58 : (Serracca <i>et al.</i> , 2013), 59 : (Setyobudi <i>et al.</i> , 2011), 60 : (Shamsi <i>et al.</i> , 2011), 61 (Shields <i>et al.</i> , 2002), 62 : (Strømnes et Andersen, 1998), 63 : (Szostakowska <i>et al.</i> , 2005) (FJ Rello <i>et al.</i> , 2008), 64 : (Tolonen et Karlsbakk, 2003), 65 : (John W. Smith et Wootten, 1975), 66 : (Strømnes et Andersen, 1998), 67 (Szostakowska <i>et al.</i> , 2005) 68 : (Suzuki <i>et al.</i> , 2010), 69 : (Valero <i>et al.</i> , 2000), 70 : (Wootten <i>et al.</i> , 2009), (Wootten <i>et al.</i> , 2010), 72 : (Zhang <i>et al.</i> , 2007)

D'après ces Tableaux IIIa, IIIb, IIIc et IIIc, les poissons provenant de l'océan Atlantique Nord et Nord-Est et de la mer du Nord sont parasités par *Anisakis* sp., *A. simplex* (s.l.), *A. simplex* (s.s), *A. typica*, *A. pegreffii*, *A. ziphidarum*, *A. physeteris*, *A. brevispiculata*, des hybrides *A. simplex* x *A. pegreffii*, *Contracaecum* sp., *C. osculatum*, *Pseudoterranova decipiens*, *Hysterothylacium* sp., *H. aduncum*, *Raphidascaris acus*. Dans l'océan Atlantique Sud comme par exemple dans le golfe de San Matias, *A. simplex* et *Pseudoterranova* sp. ont été identifiés.

Anisakis sp., *A. simplex*, *A. pegreffii*, des hybrides *A. simplex* x *A. pegreffii*, *A. physeteris*, *A. typica*, *Contracaecum* sp., *Hysterothylacium* sp., *H. aduncum*, *H. fabri* ont été retrouvés chez les poissons en mer Méditerranée y compris la mer Egée, la mer Tyrrhénienne, la mer Adriatique et la mer de Ligurie.

Dans l'océan Pacifique comme par exemple dans le détroit de Puget (eaux territoriales des Etats-Unis), au large de la péninsule de Corée, dans la mer du Japon, la mer Jaune, la grande Baie de l'Australie, *Anisakis* spp., *Anisakis* sp., des hybrides *A. simplex* x *A. pegreffii*, *A. simplex* (s.s), *Hysterothylacium* sp. et *Pseudoterranova* sp. ont été observés.

A. simplex, *Contracaecum* sp., *P. decipiens* et *H. aduncum*. ont été identifiés chez des poissons de provenance inconnue et qui ont été échantillonnés au marché de Rungis.

Dans les Tableau IIIa, IIIb, IIIc et IIId, les poissons ont été classés en fonction du niveau de prévalence des Anisakidae et par famille de poisson. Les poissons ont été classés dans l'ordre décroissant des chiffres maximaux de prévalence des Anisakidae rapportés dans chaque étude. Quatre catégories de prévalence ont été constituées : les espèces de poisson qui étaient parasitées par les Anisakidae à 100 %, celles qui sont parasitées de 60 % à moins de 100 %, de 10 % à moins de 60 % et de 0 % à moins de 10 %. Ceux qui ont été observés parasités à 100 % étaient par exemple le merlan bleu, le maquereau espagnol, le merlu commun et le cabillaud. Ceux qui ont été observés parasités de 60 à moins de 100 % étaient le hareng commun, l'anchois, le bar commun, le rouget de roche, le tacaud commun, le hareng du pacifique, et le lieu jaune. La dorade royale, la loche, le rouget barbet, le saumon argenté, le congre, le pageot, la sardine commune, l'omble chevalier et le capelan de Méditerranée ont été observés parasités par des Anisakidae de 10 à moins de 60 %. Ceux qui ont été observés avec de faibles taux de prévalence (moins de 10 %) étaient la lingue franche, le poulamon atlantique, la baudroie rousse, la sardinella ronde et le flet d'europe.

En revanche, toutes les espèces n'ont pas été échantillonnées de la même façon. Il est donc difficile de juger, de façon globale, quelle espèce est la plus parasitée. Ainsi, les 5 espèces parasitées à 100 % présentaient des tailles d'échantillon inférieures à 30 individus et sur une seule étude par espèce. Ces nombres sont faibles en comparaison des espèces pour lesquelles plusieurs centaines ou milliers d'individus ont été analysés. Le fait que le saumon rouge et le saumon du Pacifique étaient sauvages, leur prévalence est élevée par rapport au saumon de l'Atlantique issu de l'élevage. Mais il est rapporté également que les saumons d'élevage de l'Atlantique sont parasités. Mais ceux qui sont infectés ne sont pas destinés aux consommateurs (Mo *et al.*, 2014).

D'après la littérature, toutes les espèces de poisson étudiées étaient parasitées par des nématodes appartenant au genre *Anisakis* (Tableau IIIa, b, c et d). Dans la présente analyse (Tableau IIIa à IIId et Annexe 6), toutes les espèces étaient parasitées par *A. simplex* sauf 18 espèces dont 16 étaient infestés par *Anisakis* sp. qui pourrait être *A. simplex*. *Anisakis physeteris* était présent dans le merlan bleu, le maquereau espagnol, le merlu, le chinchard bleu et le saumon japonais. *Anisakis pegreffii* a été retrouvé chez 9 espèces de poisson. *Anisakis ziphydarum* et *A. typica* étaient présents chez 4 espèces. Le genre *Pseudoterranova* a été retrouvé chez 21 espèces de poisson, l'espèce *Pseudoterranova decipiens* étant la plus fréquemment identifiée. *Contracaecum osculatum* était présent chez 2 espèces, *Contracaecum* sp. chez 12 espèces de poissons. *Hysterothylacium aduncum* a été observé chez 12 espèces, *Hysterothylacium* sp. chez 16 espèces.

II.1.3. Hôte définitif

La Figure 10 schématise le phénomène de coévolution entre hôtes définitifs et les espèces du genre *Anisakis* à l'aide d'arbres phylogénétiques faits à partir de leurs séquences d'ADN du gène *COX2* (Mattiucci *et al.*, 2008 ; Nikaido *et al.*, 2001). Les hôtes définitifs d'*A. physeteris*, *A. brevispiculata* et *A. paggiae* sont les cachalots (*Physeter catodon*, *Kogia breviceps* et *K. sima*) ; pour le complexe *A. simplex* et *A. typica*, les hôtes définitifs sont les dauphins océaniques (*Delphinidae*) et arctiques (*Monodontidae*) et le marsouin de Dall (*Phocoenidae*). Les baleines à bec *Ziphius cavirostris*, *Mesoplodon layardii*, *M. mirus* et *M. grayi* sont les hôtes définitifs d'*A. ziphidarum*, d'*Anisakis* sp. et d'*Anisakis* appartenant à la clade I.

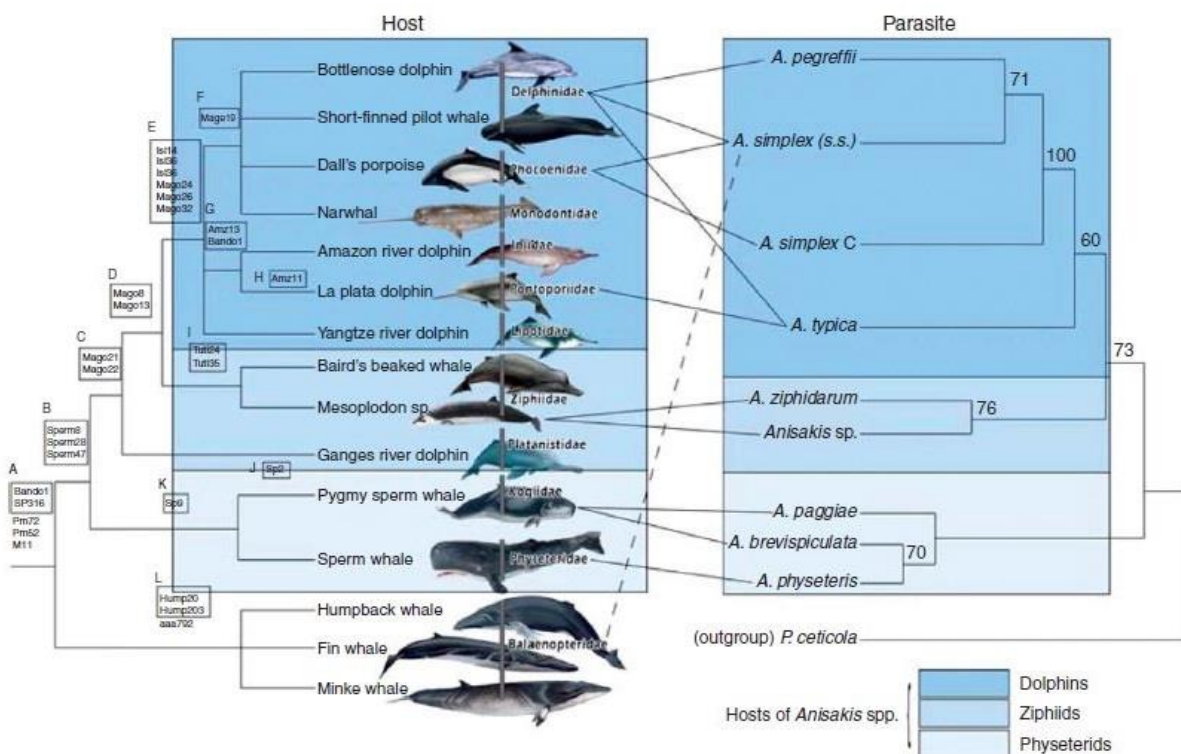


Figure 10 : Phénomènes de co-évolution suspectés entre les espèces d'*Anisakis* spp. (*COX2*) et leurs hôtes cétacés (12s, 16s et Cytochrome b) à partir d'analyses phylogénétiques (Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Nikaido *et al.*, 2001). Ligne pleine : la relation fréquente entre hôte définitif et *Anisakis* spp., ligne en pointillé : une infection non fréquente dans une autre famille

Les hôtes définitifs de *Contracaecum* spp. sont des pinnipèdes et des oiseaux marins. *Contracaecum rudolphii* est chez *Phalacrocorax carbo* (Kanarek et Bohdanowicz, 2009), *C. multipapillatum* a été observé chez les cormorans pygmés (*Phalacrocorax pygmaeus*) (Al-Moussawi et Mohammad, 2011) et *C. rudolphii* et *C. microcephalum* chez le héron pourpré (*Ardea purpurea*). Le complexe *Contracaecum osculatum* et *Phocascaris* spp. ont été identifiés chez les *Phocinae* en région boréale, *C. mirounga* et *C. radiatum* ont été identifiés chez les *Monachinae* en région antarctique et sub-antarctique. Les *Otariinae* comme *Zalophus californianus* et les

Arctocephalinae (*Arctocephalus* spp.) sont des hôtes du complexe *C. ormorhini* (*C. margolis* et *C. ormorhini* (s.s)) (Figure 11).

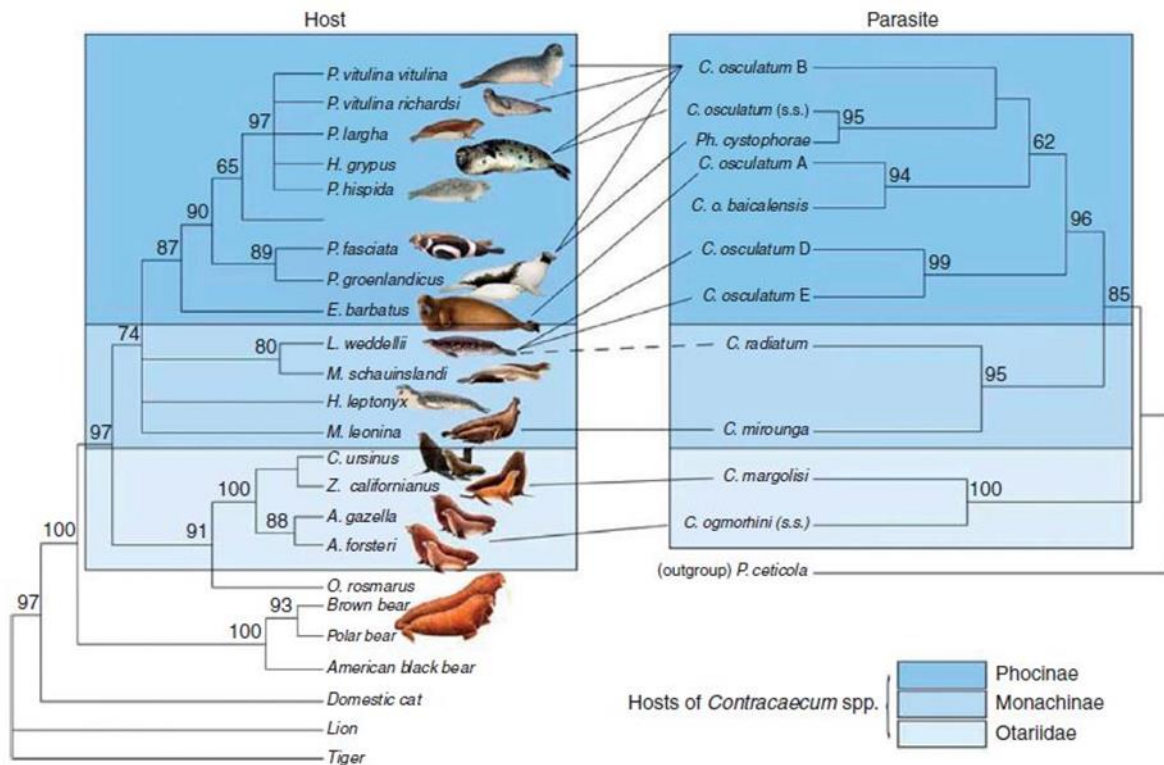


Figure 11 : Relation entre les espèces de *Contracaecum* spp. (COX2) et leurs hôtes pinnipèdes (12s, 16s et Cytochrome b). Obtenue à partir d'analyses phylogénétiques des séquences issues d'analyse moléculaire (Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Nikaido *et al.*, 2001). Ligne pleine : la relation fréquente entre hôte définitif et *Contracaecum* spp., ligne en pointillé : une infection non fréquente dans une autre famille

Les hôtes définitifs de *P. decipiens* sont les phoques, les morses et les lions de mer (Klimpel *et al.*, 2004). *Pseudoterranova decipiens* (s.s.) a été identifié comme parasite au stade adulte du phoque commun (*Phoca vitulina*) et du phoque gris (*Halichoerus grypus*), à la fois à l'Est et à l'Ouest de l'océan Atlantique. Sur la Figure 12, *P. bulbosa* colonise une seule espèce de phoque, *Erignathus barbatus* à l'Est et à l'Ouest de l'océan Atlantique. Cette espèce a également été identifiée dans l'océan Pacifique (Mattiucci et Nascetti, 2008). Tandis qu'à l'Est de l'océan Atlantique nord, *P. decipiens* (s.s) et *P. krabbei* sont des espèces sympatriques chez les phoques commun (*Phoca vitulina*) et gris (*Halichoerus grypus*). Entre *P. krabbei* et *P. decipiens*, *P. decipiens* (s.s) est dominant chez le phoque commun et *P. krabbei* chez le phoque gris.

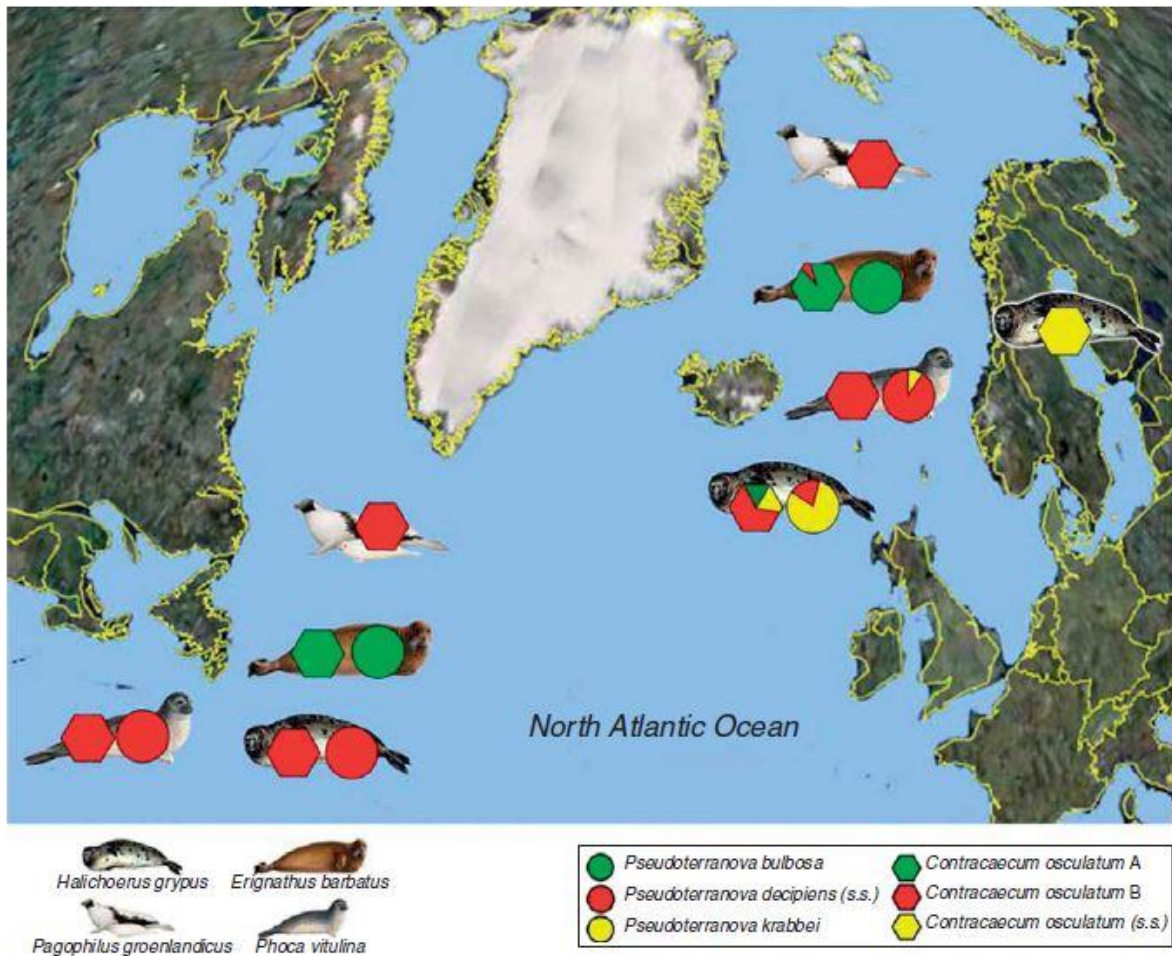


Figure 12 : Distribution des nématodes appartenant au genre *Pseudoterranova* et au complexe *Contracaecum osculatum* chez leurs hôtes pinnipèdes (Mattiucci et Nascetti, 2008)

Pour *Hysterothylacium* spp., les poissons sont également les hôtes définitifs (voir Tableau IIIa, IIIb, IIIc et III d et Figure 8). Plusieurs espèces de poissons sont parasitées par *Hysterothylacium* spp. mais aucune relation entre espèce de parasite et type d'hôte définitif n'a été démontrée par des analyses moléculaire dans la littérature.

Certaines espèces de parasites ont une spécificité d'hôte étroite (ex : *P. bulbosa*) et d'autres ont un spectre d'hôtes plus large (ex : *P. decipiens*). Pour ces 3 genres (*Anisakis*, *Pseudoterranova* et *Contracaecum*), chaque espèce a un hôte définitif de préférence.

II.2. Distribution géographique des genres et espèces d'Anisakidae

A ce jour, peu de données sont disponibles sur la répartition de ces parasites (*Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium*) dans les produits de la pêche couramment consommés en France (Angot, 1993 ; Chord-Auger *et al.*, 1995 ; Huang, 1988) et aucune donnée n'a été acquise concernant la présence de parasites adultes dans les mammifères marins. La plupart des données concernant la distribution des genres d'Anisakidae est rapportée dans la revue de

Simonetta et Nascetti de 2008 (Figure 13). Les genres *Anisakis*, *Pseudoterranova* et *Contracaecum* ont été identifiés chez l'hôte intermédiaire, l'hôte paraténique, l'hôte définitif, dans l'un et/ou l'autre de ces hôtes. Les parasites du genre *Hysterothylacium* spp. ne sont en revanche pas inclus sur cette carte (Mattiucci et Nascetti, 2008).

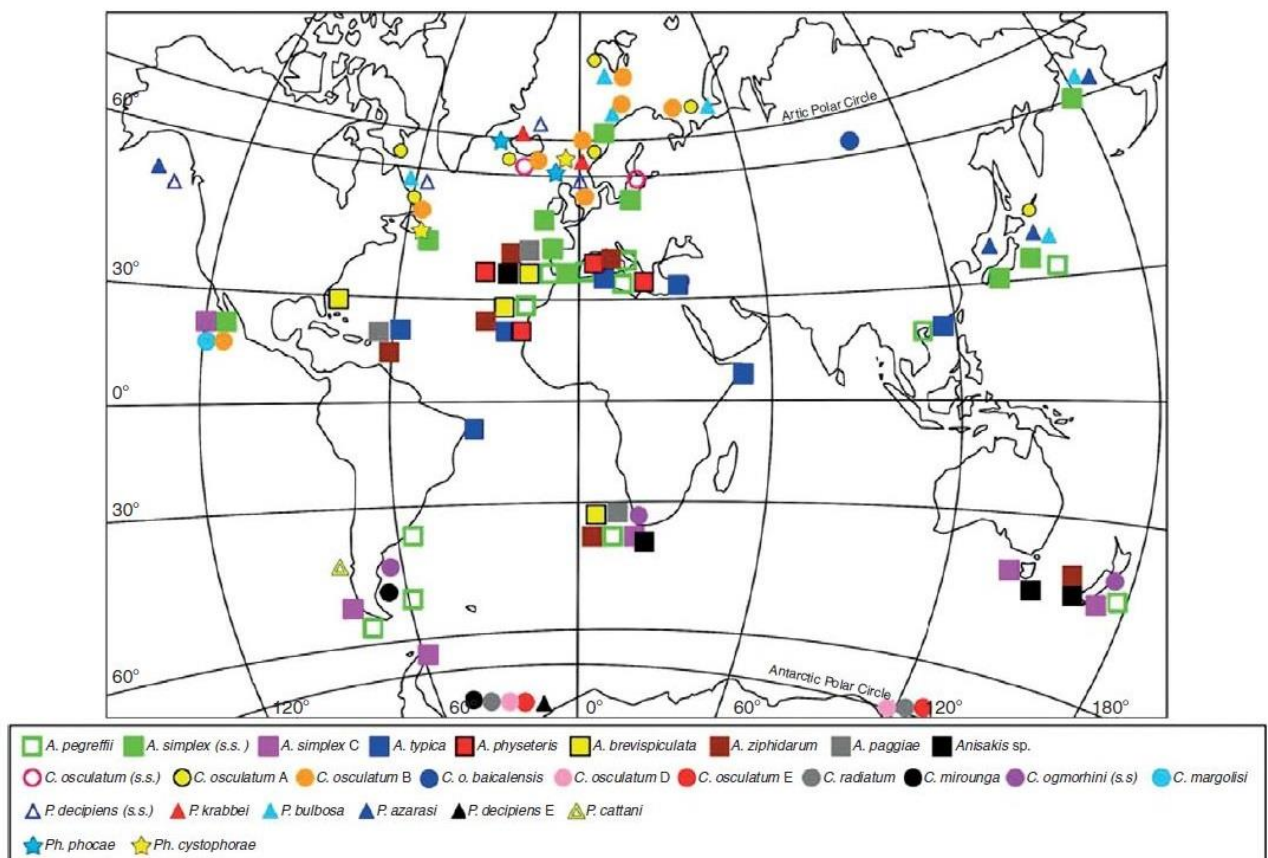


Figure 13 : Carte de répartition des Anisakidae (*Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* et *Phocaris*) dans le monde (Mattiucci et Nascetti, 2008).

Chaque signe géométrique représente un genre d'Anisakidae : *Anisakis* (carré) *Contracaecum* (rond) et *Pseudoterranova* (triangle). Les différentes couleurs correspondent aux différentes espèces.

Les espèces appartenant au même genre se ressemblent d'un point de vue morphologique. La notion de complexe d'espèces (clade) a été développée grâce aux techniques d'identification moléculaire. Celles-ci rendent possible la distinction des différentes espèces au sein d'un même genre.

Selon l'analyse phylogénétique, *Anisakis* spp. est séparé en 2 clades. Le clade I comprend le complexe *Anisakis simplex* (*A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* et *A. simplex* C, récemment nommé *A. berlandi*), *A. typica*, *A. ziphidarum* et *Anisakis* sp. Le clade II comprend les espèces *A. physeteris*, *A. brevispiculata* et *A. paggiae*. Il existe également une classification issue de l'observation morphologique séparant les larves d'*Anisakis* en type I et II (Berland, 1961). En comparant les deux

classifications, le clade I correspond au type morphologique I et le clade II au type morphologique II. La distribution géographique des Anisakidae se répartit comme suit :

II.2.1. Anisakis spp., Dujardin, 1845

- *Anisakis* spp. Clade I

A. simplex (s.s) a été décrit par Rudolphi en 1809. « *sensu stricto* » veut dire au sens strict. Cette espèce est très largement répartie de 35 °N au cercle polaire Arctique. Elle est présente à l'Ouest et à l'Est de l'océan Atlantique et dans l'océan Pacifique (Abe *et al.*, 2006 ; Abollo *et al.*, 2001 ; Mattiucci *et al.*, 1997 ; Mattiucci *et al.*, 1998 ; Nadler et Rohde, 2005 ; Paggi *et al.*, 1998 ; Umehara *et al.*, 2008 ; Umehara *et al.*, 2006). La limite sud de cette espèce se situe pour l'océan Atlantique Nord-Est autour de la zone du détroit de Gibraltar. Elle est occasionnellement retrouvée dans l'Ouest de la mer Méditerranée à cause de la migration des poissons pélagiques de l'océan Atlantique vers la mer d'Alboran (Mattiucci *et al.*, 2007 ; Mattiucci *et al.*, 2004). Cette espèce a été identifiée dans 9 espèces d'hôtes définitifs cétacés, plusieurs espèces de céphalopodes et de poissons. Il y a une sympatrie entre *A. simplex* (s.s) et *A. pegreffii* dans les eaux de l'océan Atlantique (Abollo *et al.*, 2001 ; Marques *et al.*, 2006 ; Mattiucci *et al.*, 2004 ; Mattiucci et Nascetti, 2007 ; Mattiucci *et al.*, 1997 ; Pontes *et al.*, 2005), de la mer d'Alboran (Mattiucci et Nascetti, 2007) et de la mer du Japon (Umehara *et al.*, 2006). *Anisakis simplex* (s.s) et *A. simplex* C sont présents dans les hôtes intermédiaires, paraténiques et définitifs à l'Est de l'océan Pacifique (Mattiucci *et al.*, 1997). L'espèce *A. simplex* (s.s) a également été retrouvée au large de la péninsule de Corée (Bak *et al.*, 2014).

A. pegreffii Campana-Rouget et Biocca, 1955 était appelée *A. simplex* A, c'est une espèce dominante dans les poissons en mer Méditerranée et elle a été identifiée dans une large proportion d'espèces de poisson pélagiques et démersales (Farjallah *et al.*, 2008 ; Mattiucci *et al.*, 2007 ; Mattiucci *et al.*, 1997 ; Paggi *et al.*, 1998) . L'espèce *A. pegreffii* est également répandue au large de l'Australie (30 °N, 55 °S) (Mattiucci *et al.*, 1997). Dans l'océan Atlantique, sa limite nord est située au niveau de la péninsule Ibérique (Abollo *et al.*, 2001 ; Marques *et al.*, 2006 ; Mattiucci *et al.*, 1997 ; Pontes *et al.*, 2005) . Elle n'a jamais été rapportée jusqu'à présent dans l'Ouest de l'océan Atlantique. Ses hôtes définitifs sont des dauphins de la famille des *Delphinidae*. Des infections mixtes à *A. simplex* (s.s) et *A. pegreffii* existent chez 2 hôtes définitifs et 16 hôtes intermédiaires et paraténiques au large de la côte Atlantique Ibérique, à l'Ouest de la mer Méditerranée et dans la mer du Japon. On retrouve également des infections mixtes avec *A. simplex* C dans les eaux australes de la Nouvelle-Zélande , le sud de la côte Africaine et le sud de la côte Chilienne (Mattiucci et Nascetti, 2008). *A. pegreffii* est également présent dans les poissons des eaux de la mer du Japon (Suzuki *et al.*, 2010).

A. simplex C Nascetti *et al.*, 1986 récemment nommée *A. berlandi* (Mattiucci *et al.*, 2014) est une espèce génétiquement proche de *A. simplex s.s.* Elle est retrouvée au large de la côte pacifique du Canada et du Chili, de la côte de la Nouvelle-Zélande et dans le sud de l'océan Atlantique au large de l'Afrique du Sud (Mattiucci *et al.*, 1997). Les adultes sont présents dans les cétacés de famille *Delphinidae* (*Pseudoca crassidens*, *Globicephala melaena*) et l'infection mixte avec *A. pegreffii* a été rapportée dans quelques espèces de poissons. L'espèce *A. simplex C* a été identifiée chez éléphant de mer *Mirounga leonina* dans la région sub-Antarctique et chez *M. angustirostis*, espèce présente dans le Nord-Est de l'océan Pacifique (Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Nadler et Rohde, 2005).

A. typica (Diesing, 1860). Cette espèce peut être retrouvée entre 30 °S et 35 °N de latitudes dans les eaux tempérées et tropicales (Mattiucci *et al.*, 2002). L'hôte définitif est le dauphin bleu et blanc (*Stenella coeruleoalba*) et les larves sont présentes dans plusieurs espèces de poissons y compris des merlus (*Merluccius merluccius*) de l'Est de la mer Méditerranée. On retrouve cette espèce dans cette zone car les hôtes paraténiques et intermédiaires migrent en provenance de l'océan Indien *via* le canal de Suez (Mattiucci *et al.*, 2004). *Anisakis typica* est retrouvé également dans les eaux du Portugal dans l'océan Atlantique Nord-Est chez le flet commun (*Platichthys flesus*) (Marques *et al.*, 2006). Mais cette espèce d'Anisakidae est rare au large des côtes d'Afrique du Nord. Elle est présente également en mer de Chine (Zhu *et al.*, 2007), dans l'océan Pacifique Nord (Chen et Shih, 2015) et en mer de Makassar en Indonésie (Anshary *et al.*, 2014).

A. ziphidarum Paggi *et al.*, 1988 a été identifiée pour la première fois sous la forme adulte chez les baleines à bec de Layard et de Cuvier (*Mesoplodon layardien* et *Ziphius cavirostris*, respectivement) dans l'océan Atlantique sud au large des côtes d'Afrique du Sud (Paggi *et al.*, 1998). *Anisakis ziphidarum* est aussi présente chez la baleine à bec (*Mesoplodon sp.*) en mer des Caraïbes. Elle est retrouvée également en mer Méditerranée chez la baleine de Cuvier (*Ziphius cavirostris*). *A. ziphidarum* a été identifiée chez les baleines à bec de True et de Gray (*M. mirus*, *M. grayi*, respectivement) dans les eaux de l'océan Atlantique sud (Mattiucci et Nascetti, 2006). Le spectre d'hôtes définitifs de cette espèce est donc large. Sa prévalence est faible dans certaines espèces de poisson comme par exemple le merlu (*Merluccius merluccius*) (Mattiucci *et al.*, 2004) et le sabre noir (*Aphanopus carbo*) (Pontes *et al.*, 2005). Dans l'océan Atlantique central, *A. ziphidarum* infeste surtout les calmars qui sont les proies principales des baleines à bec (Mattiucci et Nascetti, 2008). *A. ziphidarum* a été identifiée chez 5 espèces de poisson et une espèce de céphalopode en mer près de la ville de Makassar en Indonésie (Anshary *et al.*, 2014).

A. nascettii Mattiucci *et al.*, 2009 est décrit dans la revue de Mattiucci *et al.*, 2008 comme *Anisakis sp.*, membre du clade I. C'est une espèce morphologiquement et génétiquement (COX2)

proche d'*A. ziphidarum*. Elle a été identifiée chez la baleine à bec (*Mesoplodon* spp.) des côtes de la Nouvelle-Zélande et de l'Afrique du Sud.

Anisakis sp. est une espèce qui n'a pas encore été formellement décrite. Elle a été identifiée au stade L4 par Valentini (Valentini *et al.*, 2006), chez les baleines à bec de True et de Gray (*M. mirus* et *M. grayi*) au large des côtes de l'Afrique du Sud, de la Nouvelle-Zélande et en mer de Tasman. La larve de stade L3 a été identifiée dans l'océan Atlantique Nord-Est. *Anisakis* sp. a été rapporté également chez le sabre noir (*Aphanopus carbo*) et le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) (Pontes *et al.*, 2005) en mer Méditerranée. Les saumons rouges (*Onchorynchus nerka*) du détroit de Puget (Deardorff et Kent, 1989), le maquereau roi (*Scomberomorus cavalla*) qui vit au large de la côte brésilienne (Dias *et al.*, 2011), la courbine caroune (*Johnius carouna*) du golfe de Thaïlande, la bourrugue chèvre (*Dendrophysa russelli*) (Nuchjangreed *et al.*, 2006) au large des côtes du Japon, les poissons-sabres (*Trichiurus* spp.) (Umehara *et al.*, 2010) et 22 autres espèces de poisson vivant dans l'océan Pacifique (Myers, 1979) hébergent tous cette espèce *Anisakis* sp.

- *Anisakis* spp. Clade II

A. physeteris (Baylis, 1923) est réparti en mer Méditerranée et dans l'océan Atlantique. Cette espèce est présente en mer Méditerranée chez le grand cachalot (*Physeter macrocephalus*) qui est son hôte définitif (Mattiucci *et al.*, 1986). Elle a été retrouvée seulement chez quelques espèces de poisson (Mattiucci *et al.*, 1986), comme l'espadon (*Xiphias gladius*) qui est un hôte accidentel pour *A. physeteris* en mer Méditerranée et dans l'océan Atlantique. *A. physeteris* (Mattiucci *et al.*, 2007) a été identifié chez le maquereau tacheté (*Scomber australasicus*) dans l'océan Pacifique Nord (Chen et Shih, 2015).

A. brevispiculata Dollfus, 1966 a été découvert par Dollfus en 1966. Cette espèce est retrouvée au large de l'Afrique du Sud et de la péninsule Ibérique dans l'océan Atlantique Nord-Est (Mattiucci *et al.*, 2001). Le cachalot pygmé (*Kogia breviceps*) en est l'hôte définitif au sud de l'Afrique et dans l'océan Atlantique Nord-Est (côte Ibérique). Morphologiquement, il ressemble à *A. physeteris* puisque les deux espèces ont longtemps été considérées comme une seule. *A. brevispiculata* a été identifiée rarement chez le merlu (*Merluccius merluccius*) (Mattiucci *et al.*, 2007) et l'espadon (*Xiphias gladius*) dans l'océan Atlantique (Mattiucci et Nascetti, 2008).

A. paggiae Mattiucci *et al.*, 2005 a été identifiée chez le cachalot pygmé (*K. breviceps*) et le cachalot nain (*K. sima*) au large de la Floride et de la côte Atlantique de l'Afrique du Sud (Mattiucci *et al.*, 2005). Cette espèce infeste rarement les poissons de l'océan Atlantique. Elle infecte *M. merluccius* et *X. gladius* (Mattiucci et Nascetti, 2008) et a été identifiée chez le maquereau tacheté (*S. australasicus*) dans l'océan Pacifique Nord (Chen et Shih, 2015).

Anisakis sp. génotype 2 a été retrouvée chez les espadons (*X. gladius*) dans la zone équatoriale (Mattiucci et Nascetti, 2007). Cette espèce est génétiquement proche d'*A. physeteris*.

II.2.2. *Pseudoterranova* spp., Mozgovoï, 1951

P. decipiens (*sensu stricto*, Krabbe, 1878), encore appelé *P. decipiens* B par Paggi en 1991 (Paggi *et al.*, 1991) est surtout répartie dans les régions arctique et sub-arctique de l'océan Atlantique Nord-Est (Ecosse, îles Féroé, sud de l'Islande et eaux Norvégiennes), l'océan Atlantique Canadien (Terre-Neuve et golfe du Saint-Laurent) et les eaux canadiennes de l'océan Pacifique (Bratley et Stenson, 1993 ; Paggi *et al.*, 1991). Des zones de sympatrie existent entre *P. decipiens* et d'autres espèces appartenant au complexe *P. decipiens* par exemple dans les eaux canadiennes de l'océan Atlantique Nord-Est (*P. krabbei* et *P. bulbosa*). *P. decipiens* a également été identifiée en mer Baltique chez les cabillauds (*Gadus morhua*) (Lunneryd *et al.*, 2015 ; Szostakowska *et al.*, 2005).

P. krabbei Paggi *et al.*, 2000 était appelé auparavant *P. decipiens* A . A ce jour, il n'est retrouvé que dans l'océan Atlantique Nord-Est (Ecosse, îles Féroé, sud de l'Islande et eaux Norvégiennes). Ce sont principalement les adultes qui sont présents chez les phoques gris (*Halichoerus grypus*) et les phoques communs (*Phoca vitulina*) souvent en infection mixte avec *P. decipiens* (s.s). A l'Est de l'océan Atlantique, de la sympatrie a été observée entre *P. decipiens* (ss) et *P. krabbei* chez le phoque gris plutôt que chez le phoque commun. La larve de *P. krabbei* a été identifiée par des techniques moléculaires comme étant un parasite du cabillaud (*G. morhua*), de l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*) et du lieu noir (*Pollachius virens*) (Paggi *et al.*, 1991).

P. bulbosa (Cobb, 1888) était auparavant nommée *P. decipiens* C. (Paggi *et al.*, 1991) Cette espèce a été retrouvée en mers de Barents et de Norvège, dans l'océan Atlantique au large du Canada et en mer du Japon, entre les latitudes 40 °N et 80 °N (Bratley et Stenson, 1993 ; Paggi *et al.*, 1991). Son principal hôte définitif jusqu'à présent est le phoque barbu : *Erignathus barbatus* (Mattiucci et Nascetti, 2008). Dans cet hôte phocidé de la mer Otaru du Japon, *P. bulbosa* a été identifiée en infection mixte avec *P. azarasi*. Les poissons plats benthiques tels que la plie canadienne (*Hippoglossoides platessoides*) et le flétan noir (*Reinhardtius hippoglossoides*) sont rapportés comme hôtes intermédiaires.

P. azarasi (Yamaguti et Arima, 1942) Cette espèce était auparavant dénommée *P. decipiens* D. Son principal hôte définitif identifié est le lion de mer de Steller (*Eumetopias jubatus*). Sa répartition géographique semble limitée aux eaux japonaises et aux eaux bordant l'île russe de Sakhaline au Nord de l'océan Pacifique (Mattiucci *et al.*, 1998).

***P. decipiens* E**, ce taxon a été caractérisé par des techniques moléculaires chez le phoque de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) en Antarctique. De rares données sont disponibles à ce jour en ce qui concerne la nature de son hôte intermédiaire, bien que les larves de cette espèce aient été retrouvées comme parasites de poissons benthiques dans les eaux sub-antarctiques (Mattiucci et Nascetti, 2008).

P. cattani George-Nascimento et Urrutia, 2000: cette espèce a été retrouvée au stade adulte chez l'otarie à crinière (*Otaria byronia*) au large des côtes chiliennes (Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Zhu *et al.*, 2002). Elle a également été identifiée chez la légine australe (*Dissostichus eleginoides*) (Gay *et al.*, com. pers).

II.2.3. *Contracaecum* spp., Railliet & Henry, 1912

- Le complexe *C. osculatum* (Rudolphi, 1802)

***C. osculatum* A** (Nascetti *et al.*, 1993) se trouve dans les mers de Norvège et de Barents, au large de la côte atlantique du Canada, en mer d'Islande, dans l'océan Pacifique et en mer du Japon. Son principal hôte définitif est le phoque barbu (*E. barbatus*) à la fois à l'Ouest et à l'Est de l'océan Atlantique Nord, mais le phoque gris (*H. grypus*) a également été décrit comme hôte (Bratney et Stenson, 1993). Par la suite, cette espèce a été identifiée par des techniques moléculaires chez le lion de mer de Steller (*E. jubatus*) dans l'océan Pacifique occidental (mer du Japon) (Mattiucci *et al.*, 1998). Ses larves ont été identifiées chez le lieu jaune d'Alaska (*Theragra chalcogramma*) de la mer du Japon (Mattiucci et Nascetti, 2008).

***C. osculatum* B** (Nascetti *et al.*, 1993) a été détectée pour la première fois au stade adulte chez les phocidés (phoque Groenland : *Pagophilus groenlandicus*, phoque commun : *P. vitulina* et phoque gris : *Halichoerus grypus*) du Nord-Est et Nord-Ouest de l'océan Atlantique (Bratney et Stenson, 1993 ; Nascetti *et al.*, 1993). L'espèce *C. osculatum* B a été identifiée comme un parasite du phoque commun (*P. vitulina*) et de l'otarie de Californie (*Zalophus californianus*) dans les eaux de l'océan Pacifique nord (Mattiucci *et al.*, 1998).

C. osculatum sensu stricto (Rudolphi, 1802) : cette espèce était nommée *C. osculatum* C auparavant. Elle a été détectée chez le phoque gris (*H. grypus*). Il y a une sympatrie avec *C. osculatum* B chez des phoques gris des eaux proches de l'Islande (Nascetti *et al.*, 1993). C'est la seule espèce du complexe *C. osculatum* présente dans la mer Baltique. Jusqu'à présent, cette espèce n'a pas été identifiée dans la partie Ouest de l'Atlantique ou dans les eaux du Pacifique (Mattiucci et Nascetti, 2008).

C. osculatum D et **C. osculatum E** (Orecchia *et al.*, 1994) sont présentes en Antarctique. Ces espèces sont sympatriques dans leur hôte définitif, le phoque de Weddell (*L. weddellii*), et ont jusqu'à présent été signalés à la fois en mer de Weddell et en mer de Ross (Antarctique). Les stades larvaires de ces deux espèces ont été identifiés par des marqueurs allozymes dans plusieurs espèces de poisson appartenant aux familles *Chananchidae*, *Bathydraconidae* et *Nototheniidae*, dans lesquelles une répartition différentielle de ces deux espèces a été signalée (Mattiucci et Nascetti, 2008).

- Le complexe **C. gmorhini** Johnston et Mawson, 1941

Ce complexe d'espèces regroupe des parasites des pinnipèdes, décrit pour la première fois chez le phoque léopard (*Hydrurga leptonyx*) au Sud des eaux australiennes. L'espèce est génétiquement hétérogène ; en utilisant des marqueurs allozymes (18 loci), deux taxons isolés reproductivement (espèces jumelles) mais inclus dans la même morpho-espèce ont été révélés. Une description formelle des deux taxons a été donnée par Mattiucci *et al.* (2003) : ils ont été nommés *C. ogmorhi* (*sensu stricto*) et *C. margolisi* (Mattiucci *et al.*, 2003). Une description morphologique de *C. ogmorhini* (s.s.) a été fait chez le maquereau tâcheté (*Scomber australasicus*) (Mattiucci et Nascetti, 2008). *Contracaecum ogmorhini* (s.s.) a été détecté au stade adulte chez les *Otariidae* comme l'otarie à fourrure d'Afrique du sud ou d'Australie (*Arctocephalus pusillus pusillus* et *A. pusillus doriferus*, respectivement) et l'otarie à fourrure australe (*A. australis*) qui se reproduit sur les côtes de l'Argentine et du Chili. L'espèce *C. margolisi* a été identifiée chez l'otarie de Californie (*Z. californianus*) dans la région boréale. À ce jour, la distribution allopatrique de ces deux espèces semble être liée à celle de leurs hôtes définitifs. Leur répartition s'étend des latitudes 20 - 55 °N dans la région boréale du Pacifique et 20-50 °S dans les eaux de l'océan Atlantique Sud et de l'océan Pacifique Sud (Mattiucci et Nascetti, 2008).

Les autres *Contracaecum* au stade adulte parasite des oiseaux piscivores pourrait être **C. rudolphii** (Hartwich, 1964) ou appelé *C. spiculigerum* par avant. Il est identifié chez les cormorans (*Phalacrocorax auritus*), les canards du genre *Mergus* spp. (Kanarek et Bohdanowicz, 2009). Cette espèce est cosmopolite. **C. multipapillatum** (Drasche 1882) : a été identifié chez le cormoran (*P. auritus*) qui se nourrit de mullet dans le golfe du Mexique proche de la Louisiane (Deardorff et Overstreet, 1980).

Finalement, les parasites appartenant aux genres *Anisakis* et *Contracaecum* semblent être présents dans tous les océans alors que les parasites du genre *Pseudoterranova* infectent plutôt des hôtes répartis en mer du Nord, dans l'océan Atlantique Nord-Est et dans l'océan Pacifique.

II.2.4. Hysterothylacium spp., Ward & Magath, 1917

Le genre *Hysterothylacium* Ward et Magath, 1917 contient actuellement 65 espèces. Toutes sont parasites au stade adulte de poissons d'eau de mer, d'eau saumâtre et d'eau douce (Rello *et al.*, 2008). Vingt et une espèces sont réparties au large des côtes de l'Amérique du Nord et du Sud de l'océan Pacifique et des îles de Hawaï ; parmi ces 21 espèces, 12 sont présentes chez les poissons d'eau de mer et 3 chez les poissons d'estuaire (Gopar-Merino *et al.*, 2005). En revanche, beaucoup d'espèces sont peu connues. Peu d'espèces ont été identifiées ou caractérisées par la méthode moléculaire par exemple *H. aduncum* (Farjallah *et al.*, 2006 ; Klapper *et al.*, 2015 ; Liberato *et al.*, 2013 ; Valero *et al.*, 2000).

H. aduncum (Rudolphi, 1802), est l'espèce la plus décrite à ce jour dans les poissons marins et surtout chez les espèces d'intérêt commercial (Rello *et al.*, 2008), en particulier les gadiformes (Klimpel et Rückert, 2005). C'est le seul parasite présent dans la sardine commune (*Sardina pilchardus*) au Sud et à l'Est sur les deux côtes de l'Espagne: océan Atlantique et mer Méditerranée (Rello *et al.*, 2008) ; on la retrouve au centre et au Nord de la mer du Nord (Klimpel et Rückert, 2005). Elle a été fréquemment identifiée chez les harengs (*Clupea harengus*) et d'autres poissons appartenant à la même famille des *Clupeidae* (Køie, 1993). Selon une étude bibliographique rassemblant des données de parasitisme, voici quelques autres espèces de poisson parasitées par *H. aduncum* : le chinchard à queue jaune (*Trachurus trachurus*) en mer Méditerranée et océan Atlantique Nord-Est (Adroher *et al.*, 1996), l'anchois (*Engraulis encrasicolus*) en mer Tyrrhénienne en Italie (Liberato *et al.*, 2013), l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*) au Nord de la mer du Nord (Klimpel et Rückert, 2005), le capelan (*Phycis blennoides*) et la mustella (*Phycis phycis*) en mer Méditerranée –Est (Farjallah *et al.*, 2006).

H. deardorffoverstreeterorum (Knoff *et al.*, 2012) a été identifié chez un poisson plat (*Paralichthys isosceles*) au large de la municipalité d'Angra dos Reis sur les côtes du sud du Brésil (Gopar-Merino *et al.*, 2005).

H. cornutum (Stossich, 1904) a été identifié chez le thon (*Thunnus* spp.) au large des îles d'Hawaï, Etats-Unis (Moravec et Nagasawa, 2000).

H. fortalezae (Klein, 1973) a été identifié dans le thazard tacheté du Sud (*Scomberomorus brasiliensis*) au large de la province de Ceara au Brésil (Gopar-Merino *et al.*, 2005).

H. incurvum (Rudolphi, 1819) est un parasite de l'espadon (*X. gladius*) dans la mer Baltique, et au large de Miami, Floride, Etats-Unis (Gopar-Merino *et al.*, 2005).

H. geschei (Torres et al, 1998) et **H. habena** (Linton, 1900) ont été identifiées chez l'espèce *Opsanus tau* au large de Woods Hole, Massachusetts, Etats-Unis (Gopar-Merino et al., 2005).

H. hospitum (Solovjeva et Pozdnjakov, 1984) a été identifiée chez les requins bleus (*Prionace glauca*) au large des îles d'Hawaï, Etats-Unis (Gopar-Merino et al., 2005).

H. reliquens (Norris et Overstreet, 1975) a été identifiée dans le canal du Mississippi, Etats-Unis, chez le rondu mouton (*Archosargus probatocephalus*).

H. eurycheilum (Olsen, 1952) a été identifiée chez le mérrou (*Epinephelus itajara*) en Floride, Etats-Unis, (Gopar-Merino et al., 2005).

H. corrugatum Deardorff et Overstreet, 1981 a été identifiée chez l'espadon (*X. gladius*) au large des côtes de Miami en Floride et au large de l'Equateur (Gopar-Merino et al., 2005).

H. fabri (Rudolphi, 1819) a été identifiée par la méthode électrophorèse d'isozymes et l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD: random amplified polymorphic DNA) chez le rouget-barbet de roche (*Mullus surmuletus*), le rouget-barbet de vase (*Mullus barbatus barbatus*) et le chinchard (*Trachurus trachurus*) à l'Ouest de la mer Méditerranée (Martín-Sánchez et al., 2003)

H. patagonense (Moravec et al., 1997) était présent chez le poisson-lézard (ou anoli) à grandes écailles (*Saurida undosquamis*) de la mer Rouge au large de l'Egypte (Morsy et al., 2015).

H. liparis Li et al., 2007 était présente chez *Liparis tanakae* en mer Jaune, Chine.

Récemment, deux nouveaux types ont été identifiés par identification morphologique et moléculaire (ITS1 et ITS2) : *Hysterothylacium* type XIII chez *Abalistes stellatus* et type XIV chez le hareng à bande bleue (*Herklotsichthys quadrimaculatus*), maquereau indien (*Rastrelliger kanagurta*) et le sabre (*Trichiurus lepturus*). Les deux types sont susceptibles d'être des nouvelles espèces découvertes en Nouvelle Calédonie (Shamsi et al., 2015). Pour l'identification des *Hysterothylacium* spp. Finalement, il y a beaucoup de travaux sur l'identification d'*Hysterothylacium* au stade adulte mais il y a moins d'étude sur le stade larvaire.

II.3. Les différents facteurs impactant la distribution des Anisakidae

Il existe des facteurs intrinsèques et extrinsèques qui influencent la distribution des Anisakidae. En premier lieu, les différentes espèces d'Anisakidae ont des répartitions géographiques et spectres d'hôtes différents (voire la partie II.2 distribution des Anisakidae dans les différents types d'hôtes et facteurs influençant leur distribution). Les facteurs intrinsèques au poisson sont l'espèce, l'âge, la

taille, le poids, le sexe, la régime alimentaire, la nature de leurs muscles (teneur en lipides) et le système immunitaire. Les facteurs extrinsèques sont, entre autres, la zone géographique, le climat, le courant marin, la salinité et l'acidité de l'eau, la profondeur et la saisonnalité. Une étude faite par Hauksson *et al.*, (2012) a montré que la durée de vie d'une larve d'Anisakidae a été estimée à plusieurs années. Cinquante pour cent des larves du genre *Pseudoterranova* sp. meurent au bout de 3 ans et 90 % au bout de 10 ans chez les cabillauds. Pour *Anisakis*, 50 % meurent au bout de 4 ans et 90 % au bout de 14 ans selon une étude dans laquelle les cabillauds ont été capturés en mer puis élevés en mer dans des cages (Hauksson *et al.*, 2012).

II.3.1. Facteurs intrinsèques

Les trois critères âge, taille, poids sont liés. Il semble que souvent plus la taille du poisson augmente, plus l'infestation par les Anisakidae augmente (Bergmann et Motta, 2004). Une étude sur les chinchards (*Trachurus trachurus*), achetés sur un marché de Grenade en Espagne, a révélé que des facteurs intrinsèques influencent le niveau d'infestation par les Anisakidae dans les populations de poissons échantillonnées. En effet, les chinchards n'étaient infectés par les Anisakidae qu'à partir d'une taille de 29 cm et les individus de moins de 20 cm n'étaient pas du tout infectés (Adroher *et al.*, 1996) ce qui est en concordance avec une étude sur le saumon sauvage du Pacifique montrant que les poissons d'une longueur inférieure à 50 cm présentaient une intensité de parasitisme plus faible (Setyobudi *et al.*, 2011). Egalement, l'étude sur le contenu stomacal de *Myctophum punctatum* (spotted lanternfish) et *Notoscopelus kroyeri* (lanterne de Kroyer) a montré que la consommation de copépodes par ces deux poissons augmente en fonction de leur taille, augmentant ainsi l'infestation par les Anisakidae (Klimpel *et al.*, 2008). L'étude sur l'infestation du calmar (*Illex coindettii*), hôte intermédiaire de *A. pegreffii* a permis de déterminer la relation entre l'infestation par le parasite et le sexe, la maturité et le régime alimentaire de l'hôte (Petric *et al.*, 2011). Cette étude a également permis de suivre la dynamique de croissance d'un groupe de parasites. Les auteurs ont montré que la prévalence d'*A. pegreffii* est en hausse en automne et en baisse en été. Non seulement ceci est dû au régime alimentaire qui change avec la saison mais également au changement d'âge qui engendre donc un changement de morphologie (Petric *et al.*, 2011). Hemmingsen *et al.*, (2000) ont montré une prévalence d'*A. simplex* plus élevée chez les cabillauds plus âgés au nord de la Norvège (Hemmingsen *et al.*, 2000).

Quant à l'influence du sexe des poissons sur l'intensité de parasitisme, les études sont contradictoires. L'infestation par *Contracaecum* sp. était plus élevée chez les cabillauds mâles que chez les femelles (Hemmingsen *et al.*, 2000). En revanche, l'infestation par *A. simplex* (s.s) étudiée chez 40 bars européens (*Dicentrarchus labrax*) de poids moyen 1.45 ± 0.08 kg n'était pas influencée

par le sexe des poissons (Bernardi *et al.*, 2011). Ceci était concordant avec l'étude menée chez des saumons sauvages du Pacifique (*Oncorhynchus keta*) (Setyobudi *et al.*, 2011). (Setyobudi *et al.*, 2011)

Chaque espèce de parasite infecte un spectre d'hôtes paraténiques permettant la rencontre avec leur hôte définitif. Chaque espèce de parasite possède un nombre d'hôtes paraténiques plus ou moins grand. *Anisakis* a été identifié chez un plus grand nombre d'espèces de poissons par rapport aux autres genres d'Anisakidae (Mattiucci et Nascetti, 2008).

La forte teneur en lipides des muscles des poissons est favorable à l'installation des Anisakidae. Une étude a comparé la charge parasitaire chez des poissons gras et maigres. Elle a montré une prévalence plus élevée d'*A. simplex* dans la chair du grand sébaste (*Sebastes marinus*) que dans celle du lieu noir (*Pollachius virens*) et du cabillaud (*Gasbus moruha*). Ceci est dû aux taux élevés de matières grasses dans leurs muscles (Strømnes et Andersen, 1998).

Ce pendant la survie des larves dans les poissons dépend du système immunitaire du poisson (Levsen et Midthun, 2007).

II.3.2. Facteurs extrinsèques

La saisonnalité a été reconnue comme influençant la distribution des parasites par certains auteurs. Ainsi, Farjallah *et al.* (2006) ont décrit la saisonnalité comme un des facteurs influençant le cycle biologique des poissons et pouvant donc influencer indirectement le niveau d'infestation par les Anisakidae. Ceci a été mis en évidence à l'Est de la mer Méditerranée chez les mostelles, *Phycis blennoides* et *Phycis phycis*. Les auteurs ont montré une augmentation de la prévalence des parasites (*A. simplex*, *A. physeteris*, *H. aduncum* et *H. fabri*) au printemps et en été. A cette période de l'année, l'eau est plus chaude engendrant alors une augmentation de l'activité des poissons, qui se nourrissent plus et ont une plus forte croissance. En conséquence, la probabilité d'accumuler des parasites est accrue (Farjallah *et al.*, 2006). En revanche, Smith (1983) a suggéré que la saisonnalité n'influait pas la distribution des parasites puisque les hôtes définitifs excrètent les œufs d'*Anisakis* tout au long de l'année.

Comme abordé précédemment (partie II.1.2 distribution géographique des genres et espèces d'Anisakidae), plusieurs études ont montré que les poissons sont infectés de façon différente selon la zone de pêche. Par exemple, dans un lot d'anchois (*Engraulis encrasicolus*) provenant de l'océan Atlantique, aucun poisson n'était infecté (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 2010) alors que l'on retrouve 70 % de prévalence d'anchois pêchés en mer Méditerranée infectés par des Anisakidae (Angelucci *et al.*, 2011). Par contre, chez le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*), la prévalence en Anisakidae est plus élevée dans l'océan Atlantique Nord-Est qu'en mer Méditerranée (Abollo *et al.*, 2001 ; Angelucci *et al.*, 2011). Ceci peut être expliqué par l'abondance d'hôtes intermédiaires (Crustacés, *etc.*),

l'abondance des hôtes définitifs (Rello *et al.*, 2009) et aussi par la température de l'eau. Plusieurs études ont montré des variations de prévalence parasitaire en fonction de la zone de pêche (Adroher *et al.*, 1996 ; Bratley et Bishop, 1992 ; CEVPM, 1993 ; McClelland et Marcogliese, 1994 ; Tolonen et Karlsbakk, 2003). Une autre étude a montré que la distribution géographique des Anisakidae dans les différentes zones de pêches peut être équivalente si les niveaux d'abondance de l'hôte définitif sont homogène (Pulleiro-Potel *et al.*, 2015).

Le changement climatique d'origine anthropique engendre une augmentation des températures de l'eau océanique, de l'acidité et de la salinité et perturbe la circulation des courants océaniques. La distribution des espèces, la composition de l'écosystème marin, la biodiversité marine et la chaîne alimentaire sont donc perturbées. Par exemple, le nombre de poissons d'espèces pélagiques augmente à cause du réchauffement des eaux côtières, ce qui permet aux parasites du genre *Anisakis* d'étendre le nombre de leurs hôtes paraténiques et augmente la probabilité pour l'hôte définitif de s'infecter. C'est le cas d'un effet El Nino Southern Oscillation qui provoque la fluctuation des courants marins et le changement de climat qui influence sur le déplacement nouvel hôte définitif et également des nouvelles espèces de poisson et céphalopodes dans la région de la côte Chilienne pour *A. simplex* (Arriaza *et al.*, 2010). *A. simplex*, l'espèce qui a moins de préférence d'hôte paraténique pourra facilement s'adapter afin d'infecter un nouvel hôte final. De plus, en raison du changement climatique et de la dynamique parasite-hôte, pour continuer leur cycle de vie, les parasites peuvent induire des pathologies émergentes en affectant de nouvel hôte inhabituel (Brooks et Hoberg, 2007). De plus, il y a une augmentation de la surface marine due au réchauffement engendrant la fonte des glaciers, on assiste donc à la délocalisation ou l'extension des zones de répartition des hôtes définitifs (Klimpel et Palm, 2011). D'ailleurs, l'observation de quelques mammifères marins dans le bassin Napoléon de Boulogne-sur-mer, ville du nord de la France en serait une conséquence. Leur présence inhabituelle non fréquente à cet endroit est vraisemblablement due à l'augmentation de l'abondance de leur nourriture. L'augmentation de populations des mammifères marins est liée également à leur protection.

La Figure 14 montre les différents niveaux de profondeur et les espèces de poisson vivant à chaque profondeur. La prévalence des Anisakidae peut avoir un lien avec la profondeur à laquelle sont réparties les espèces hôtes (Pulleiro-Potel *et al.*, 2015). L'infestation des hôtes par les Anisakidae est fortement liée à leur régime alimentaire et à leur place dans la chaîne trophique. En effet, les grands poissons prédateurs mangent d'autres poissons plus petits qui pourraient être déjà infestés par un certain nombre de parasites ; les grands poissons prédateurs pourraient donc accumuler plus de parasites que les plus petits mais ce n'est pas systématique (Petrie *et al.*, 2007). Klimpel *et al.* (2006) ont montré un manque de nutriments aux niveaux mésopélagique et

bathypélagique, ce qui limite l'abondance des hôtes intermédiaires des nématodes et cestodes ; en conséquence les poissons sont plus faiblement infectés à cet endroit. En revanche, la grande quantité de biomasse en mer profonde (niveau benthique) attire les hôtes intermédiaires comme les mollusques pour les digènes ce qui engendre l'augmentation de la diversité en parasites à ce niveau de profondeur (Klimpel *et al.*, 2006). Les deux facteurs, profondeur et régime alimentaire peuvent ainsi être liés.

Un travail a montré également que les cabillauds pêchés près de la côte avaient une prévalence plus élevée en *Pseudoterranova*. Ceci est dû à l'abondance d'hôtes détinitifs près de la côte qui libèrent les œufs d'Anisakidae dans cette zone (Hauksson, 2011).

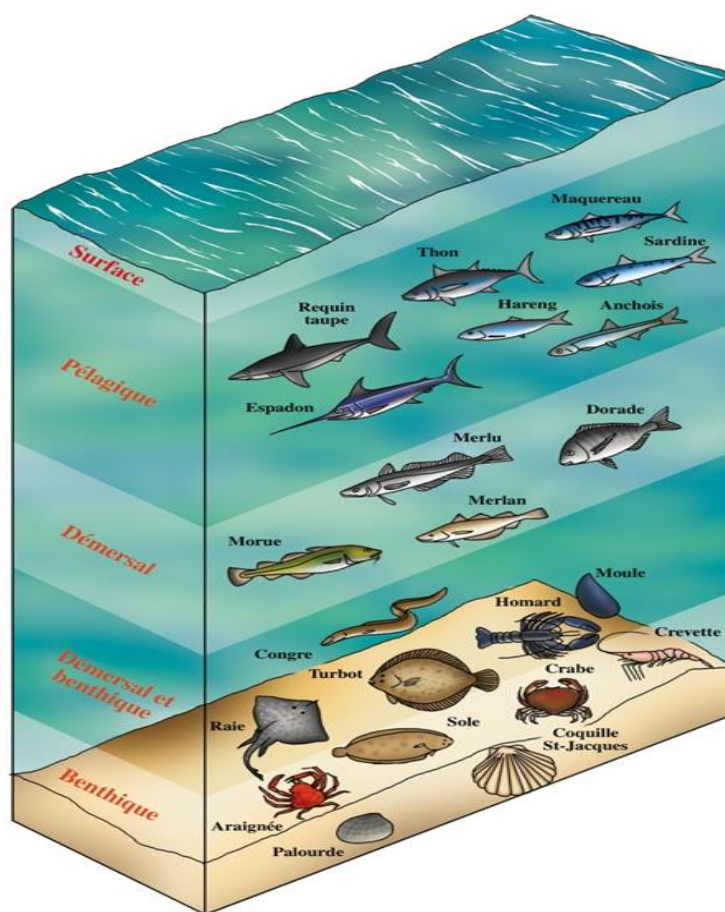


Figure 14 : Schéma représentant les différents niveaux marins avec quelques exemples d'espèces marines Surface, pélagique (subdivisé en 5 zones de profondeur croissante : épipélagique, mésopélagique, bathypélagique, abyssopélagique et hadopélagique), démersal et benthique. Schéma issu du site web de l'Ifremer (<http://wwwz.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/Les-ressources/ou/Les-profondeurs>) consulté le 14/05/2015.

II.4. Distribution des Anisakidae dans les différents organes ou tissus des poissons

Les tissus les plus consommés chez les poissons par l'Homme sont les muscles puis le foie et les viscères. Les parasites infectent les poissons et, selon le genre ou l'espèce, migrent vers les différentes localisations corporelles du poisson. Ceci nous conduit à nous interroger sur les raisons faisant que telle ou telle espèce préfère rester dans telle ou telle localisation. Cruz *et al.*, 2007 ont supposé que la migration des Anisakidae vers le muscle avait un lien avec la distance (largeur ou taille) du poisson. Ils ont posé l'hypothèse que plus le poisson est grand, moins il y a d'Anisakidae dans le muscle : la distance à parcourir pour les parasites étant trop grande. Mais aucune corrélation n'a été retrouvée pour étayer cette hypothèse. Ces auteurs ont donc suggéré que la migration est plutôt liée aux nutriments présents dans les différentes parties du poisson (Cruz *et al.*, 2007). Un autre travail sur le cabillaud et le sébaste a montré la migration des parasites des viscères vers les autres localisations corporelles de poissons. Cette migration a un lien plutôt avec les nutriments dans poisson, le réseau trophique du poisson et l'espèce de poisson également (Strømnes et Andersen, 1998). De plus, la migration des parasites vers les muscles reste élevée sur la partie ventrale, encore appelée flancs qui est proche des viscères. Donc, plus la distance est courte, plus on trouve de nématodes dans ces localisations proches de la cavité corporelle (Abattouy *et al.*, 2011 ; Klapper *et al.*, 2015). Il a été constaté également que certaines espèces de parasites préféraient certaines localisations corporelles : par exemple, l'espèce. *A. simplex* a été retrouvée dans plusieurs localisations corporelles telles que la cavité corporelle, le foie, les filets et les viscères mais les nématodes du genre *Pseudoterranova* spp. restent plutôt localisés dans les flancs (Smith et Wootten, 1984b). Mais, il a également été montré que *Pseudoterranova* spp. était retrouvé dans les muscles dorsaux de la baudroie (*Lophius piscatorius*) (Petrie *et al.*, 2007). Plusieurs études ont été réalisées *in vitro* : *A. simplex* migre mieux qu'*A. pegreffii* dans un gel d'agarose. Cette moindre capacité à migrer pourrait expliquer qu'*A. pegreffii* soit moins retrouvé dans les muscles des poissons et qu'il y a donc moins de cas d'infections humaines par cette espèce au Japon (Suzuki *et al.*, 2010). D'autres auteurs ont montré, au contraire, qu'*A. pegreffii* avait une meilleure capacité de migration qu'*A. simplex* dans un milieu artificiel à base d'agar mais l'addition de suc digestif artificiel au milieu aboutit à l'effet inverse et accroît la mortalité d'*A. pegreffii* par rapport à *A. simplex* (Jeon et Kim, 2015). Toutes ces études réalisées *in vitro* n'ont pas pris en compte le système immunitaire des poissons qui joue probablement un rôle important dans le contrôle de la migration des Anisakidae. Il a été montré que l'intensité du parasitisme dans la cavité corporelle et les muscles du saumon d'Alaska était la même qu'ils aient été immédiatement éviscérés après la capture ou stockés entiers dans la glace pendant 24 h (Karl *et al.*, 2011). Une autre étude a comparé 3 lots de harengs : un éviscéré immédiatement après la capture, un éviscéré 14 heures après la capture et un troisième éviscéré 37 heures après la

capture. Les résultats ont montré une intensité de parasitisme plus élevée dans les filets pour les poissons éviscérés 14 et 37 heures après la capture (Smith et Wootten, 1975). La migration des parasites dépend certainement de paramètres multiples: d'une part, l'espèce hôte avec son système immunitaire et la teneur en matières grasses des filets et d'autre part l'espèce du parasite (Smith et Wootten, 1975).

Une étude réalisée sur les grondins gris (*Eutrigla gurnardus*) de la mer du Nord montre une corrélation entre le nombre d'*A. simplex* présents dans le muscle et dans les viscères (Karl et Levsen, 2011).

Le Tableau IV montre la prévalence des Anisakidae dans les filets de différentes espèces de poisson. Non seulement des différences de prévalence ont été observées entre espèces, mais des différences au sein d'une même espèce mais entre zones géographiques différentes ont également été constatées.

Tableau IV : Prévalence des Anisakidae dans les muscles de différentes espèces de poisson provenant de différentes zones de pêche (Atl NE : océan Atlantique Nord-Est, MMD : mer Méditerranée, Atl - NW: océan Atlantique Nord-Ouest, MJ : mer Jaune (Chine) et PCFN : océan Pacifique Nord). * : issu de l'élevage mais non destiné à la consommation humaine à cause d'une qualité inférieure au seuil requis.

Nom latin	Nom commun	Prévalence dans les muscles (%)	Nbre de poissons analysés	Pays	Zone de pêche	Référence
<i>Clupea harengus</i>	hareng commun	71,05	76	Iles Shetland	Atl NE	Smith et Wooten, 1975
		11	214	Irlande	Atl NE	CEVPM, 1993
		20	97	Danemark	Atl NE	CEVPM, 1993
		17	52	France	Atl NE	CEVPM, 1993
		7	44	Islande	Atl NE	CEVPM, 1993
		10	30	Norvège	Atl NE	CEVPM, 1993
		43,6	78	Norvège	Atl NE	Levsen <i>et al.</i> , 2005
		42-70	200	Norvège	Atl NE	Levsen & Lunestad, 2010
<i>Engraulis encrasicolus</i>	anchois	0,7	682	France	Atl NE	Huang, 1988
		30,8	52	Italie	MMD	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
<i>Gadus morhua</i>	cabillaud	57,2	792	Espagne	Atl NE, MMD	Rello <i>et al.</i> , 2009
		0,36	1382	Islande	Atl NE	Haukssson <i>et al.</i> , 2012
		66,92	12207	Canada	Atl NE	Bratney et Bishop, 1992
<i>Lophius piscatorius</i>	baudroie	1-97	205	Canada	NW Atl	McClelland et Marcogliese, 1994
		24	25	Espagne	Atl NE	Abollo <i>et al.</i> , 2001
<i>Merluccius merluccius</i>	merlu	41,1	25	Espagne	Atl NE	Abollo <i>et al.</i> , 2001
		10	50	Italie	MMD	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
<i>Micromesistius poutassou</i>	merlan bleu	6,4	147	Espagne	Atl NE	Abollo <i>et al.</i> , 2001
		52,6	78	Norvège	Atl NE	Levsen <i>et al.</i> , 2005
		22,7	238	Portugal	Atl NE	Cruz <i>et al.</i> , 2007
		62,5	16	Italie	MMD	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
<i>Salmo salar</i> *	saumon atlantique	100	55	Ecosse	Atl NE	Wooten <i>et al.</i> , 2010
<i>Sardina pilchardus</i>	sardine commune	0,68	145	Espagne	Atl NE	Rello <i>et al.</i> , 2008
		4,04	99	Espagne	MMD	Rello <i>et al.</i> , 2008
		11,3	115	Espagne	MMD	Rello <i>et al.</i> , 2008
<i>Scomber japonicus</i>	maquereau japonais	5,5	166	Maroc	MMD, Atl NE	Abattouy <i>et al.</i> , 2011
		19,26	218	Japon	MJ et PCFN	Suzuki <i>et al.</i> , 2010
<i>Scomber scombrus</i>	maquereau commun	4,3	55	Espagne	Atl NE	Abollo, Gestal <i>et al.</i> , 2001
		9,9	214	France	-	Huang 1988
		17,5	40	Turquie	Atl NE	Pekmezci, 2014
		93,8	48	Norvège	Atl NE	Levsen <i>et al.</i> , 2005
		0,9	447	Espagne	Atl NE	Gutiérrez-Galindo <i>et al.</i> , 2010
<i>Trisopterus luscus</i>	tacaud commun	33,3	9	Italie	MMD	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
		5,04-51,08	139	Espagne	Atl NE	Rello <i>et al.</i> , 2009
<i>Trachurus trachurus</i>	chinchard	3,2	100	Espagne	Atl NE	Abollo <i>et al.</i> , 2001
		7,3	40	France	-	Huang 1988

III. Impact des Anisakidae sur la santé humaine

III.1. Clinique de l'Anisakidose et allergie

III.1.1. Définition et historique de la maladie

Depuis 1960, le terme **Anisakiase** a été employé pour la maladie causée par des larves L3 de nématodes appartenant à la famille des Anisakidae (Audicana et Kennedy, 2008) en consommant des produits de la pêche crus, peu cuits ou insuffisamment transformés (Audicana *et al.*, 2002 ; de Pécoulas *et al.*, 2014 ; Pravettoni *et al.*, 2012). A partir de 1998, le groupe d'experts de SNOAPAD (Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases) a redéfini la maladie humaine causée par les nématodes de la famille des Anisakidae qui est aujourd'hui nommée **Anisakidose** (de Pécoulas *et al.*, 2014). La maladie causée par les membres du genre *Anisakis* a été nommée **Anisakiose** (ANOFEL, 2014). La plupart des cas humains ont été causés par les nématodes appartenant aux genres *Anisakis* et, dans une moindre mesure, *Pseudoterranova*. De rares cas ont été causés par *Contracaecum*.

En 1955, 110 ans après la création du genre *Anisakis* par Dujardin (1845), l'Anisakidose a été décrite pour la première fois au Japon par Ishikura et aux Pays-Bas par Straub en 1955 (Augry, 2012). En 1960, il a été établi que cette maladie était en lien avec la consommation de poisson cru, plus précisément de hareng, aux Pays-Bas (Van Thiel, 1969 dans (Augry, 2012)). Pour diminuer le risque d'acquérir la maladie, des réglementations ont imposé, à partir de 1967, la congélation du hareng cru ou peu transformé destiné à la consommation humaine. De ce fait, le nombre de cas déclarés est passé de 192 en 1967 à 62 l'année suivante (DGAI, Direction de la qualité, 1980). En 1968, au Japon, *Anisakis* a été observé pour la première fois par endoscopie gastrique. En 1969, le premier cas humain d'Anisakidose a été décrit en France par Cavet *et al.*, en 1975 et aux Etats-Unis par Pinkus (Bouree *et al.*, 1995). Cette maladie, l'Anisakidose est généralement résolutive chez l'Homme mais il peut également être nécessaire d'enlever la larve par exemple par endoscopie : le patient est guéri en quelques jours à quelques semaines (Nieuwenhuizen et Lopata, 2013).

L'homme intervient en tant qu'hôte accidentel en consommant des produits de la pêche infectés crus ou insuffisamment cuits. Cependant, la larve L3 n'évolue pas chez l'homme. Il existe certains cas exceptionnels très rares où la larve évolue chez l'homme jusqu'au stade L4 et puis meurt (Audicana *et al.*, 2003 ; Audicana et Kennedy, 2008 ; Kliks, 1986).

III.1.2. Réponse immunitaire vis-à-vis des Anisakidae

La Figure 15 permet de comprendre globalement la réponse immunitaire de l'Homme face à *Anisakis*.

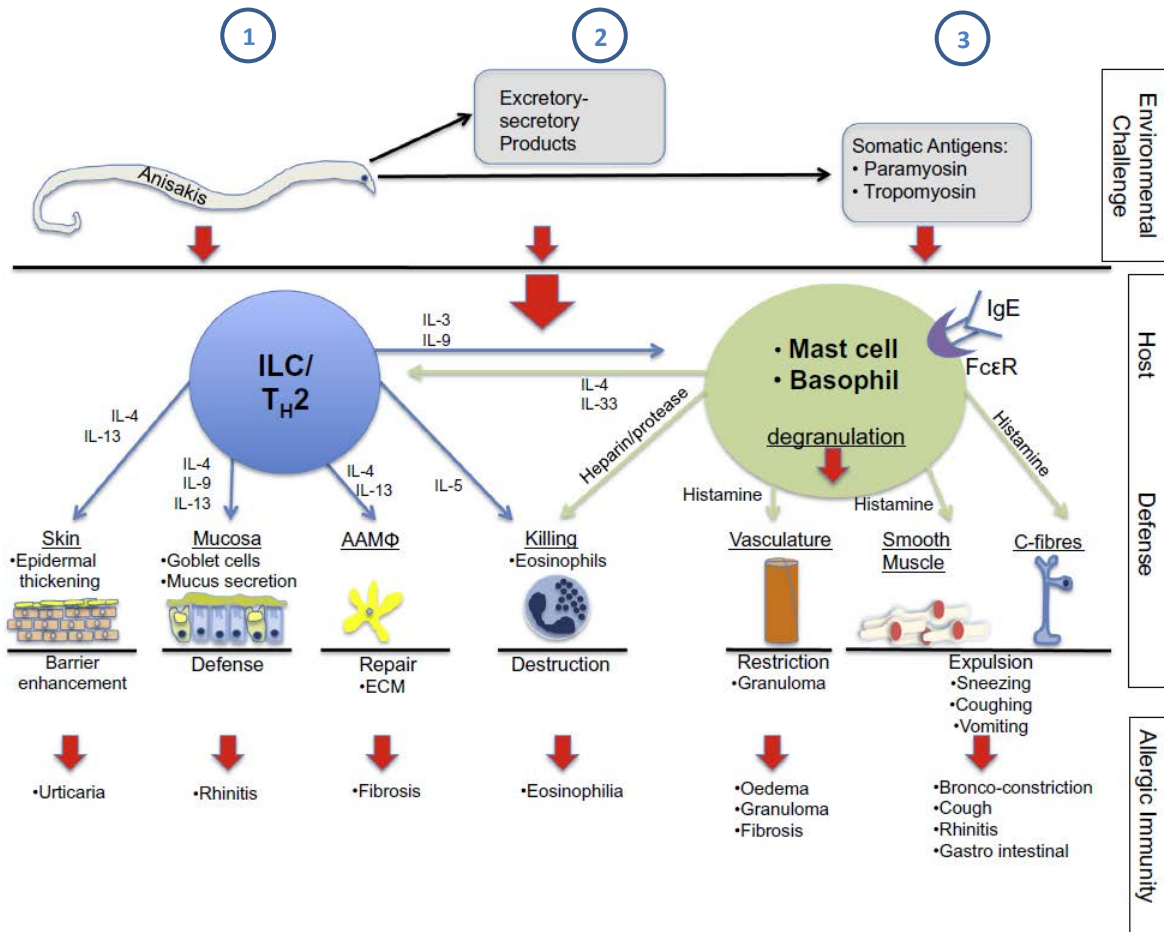


Figure 15 : Réponse immunitaire de l'Homme vis-à-vis d'*A. simplex* (Nieuwenhuizen et Lopata, 2013) .

Il y a 3 sources d'allergènes possibles (Figure 15) (Nieuwenhuizen et Lopata, 2013) : (1) les antigènes de surface du parasite vivant ou mort, (2) les allergènes sécrétés / excrétés par le parasite vivant et (3) les antigènes somatiques tels que la paramyosine et la tropomyosine libérés lors de la mort du parasite. Différentes voies du système immunitaire de l'hôte sont activées en réponse à la présence d'Anisakidae induisant différents symptômes.

Au centre de l'activation de ces mécanismes de défense vis-à-vis d'*Anisakis* et de ses différents antigènes est l'activation des cellules lymphoïdes innées et TH2 (T helper : les lymphocytes auxiliaires) ou ILC (Innate lymphoid cells ou cellules lymphoïdes innées), ce qui conduit à la sécrétion de cytokines spécifiques, comme l'IL (Inter-Leukine) -4, IL-5, IL-9 et IL-13. Ces cytokines induisent l'hyperplasie des cellules et la sécrétion de mucus. IL-4 et IL-13 agissent sur les AAM : macrophages activés alternatifs (Alternatively Activated Macrophages) pour la réparation de la matrice extracellulaire qui engendre la fibrose (ECM : matrice extracellulaire), tandis que l'IL-5 induit le

recrutement des éosinophiles pour tuer *Anisakis*. Les anticorps IgE (Immunoglobuline E) spécifiques aux allergènes d'*Anisakis* se lient aux récepteurs (FcεR : Récepteur du fragment Fe de la chaîne ε des IgE) sur la surface cellulaire des mastocytes et des basophiles. Lors de l'interaction avec les allergènes, différents médiateurs, dont les protéases et l'histamine sont libérés.

Plusieurs modes de réponse immunitaire contre l'allergie peuvent survenir tels qu'une hyperplasie des kératinocytes et des cellules caliciformes permettant une densification des couches cellulaires ainsi que la production de mucus pour renforcer la barrière contre la pénétration ou l'installation de nouveaux parasites. Les macrophages, la réparation des tissus à travers le dépôt de matrice extracellulaire et la restauration de la barrière tissulaire sont des moyens pour restreindre la propagation des helminthes. Les éosinophiles possèdent un rôle de médiation pour directement tuer les helminthes suite à la sécrétion de molécules chimiotactiques comme l'héparine ou les protéases synthétisées par les mastocytes et les basophiles. Parallèlement, l'activation des mastocytes et des basophiles induit des phénomènes annexes suite à la libération d'histamine comme les éternuements, la toux, les vomissements et la diarrhée, moyens directs d'expulsion du parasite.

III.1.3. Les différentes formes cliniques de l'Anisakidose

L'anisakidose peut se présenter sous différentes formes cliniques selon que l'hôte développe une réponse Th2 efficace lui permettant d'expulser la larve ou que l'hôte développe une réponse Th1 (T helper 1 : lymphocytes auxiliaires) avec des conséquences inflammatoires associées à des douleurs gastro-intestinales.

- Forme asymptomatique

Un cas aux Etats-Unis, premièrement diagnostiqué par coloscopie comme un adénocarcinome (saignements, anémie, présence d'une masse au niveau du colon), s'est révélé être une Anisakidose suite à l'examen histopathologique de la lésion (Hernandez-Prera et Polydorides, 2012). Il a été montré que, chez des sujets sains où les auteurs ont mesuré le taux d'anticorps sériques dirigés contre l'antigène Ani s 7 d'*Anisakis* par ELISA, la séroprévalence des patients étaient de 12.4 % dans une population non allergique (qui répond positivement à des tests sériques spécifiques) (Puente *et al.*, 2008).

- Formes digestives

Il existe plusieurs formes digestives telles que la forme gastrique aiguë, intestinale aiguë, gastrique chronique et intestinale chronique. La pathologie gastrique est répandue au Japon mais la forme intestinale est plus répandue en Europe occidentale (Hochberg et Hamer, 2010 ; de Pécoulas *et al.*, 2014 ; Pravettoni *et al.*, 2012). Il faut tenir compte du fait qu'au Japon, la plupart des cas d'Anisakidose sont traités par endoscopie, le nombre de patients est donc facilement évalué, quand

les autres pays traitent, eux, plutôt les symptômes des patients ce qui présente un risque de mauvaise estimation du nombre de cas. De ce fait, le patient guéri, les parasites ne sont pas identifiés, il peut donc y avoir un biais de déclaration des cas causés par des Anisakidae dans le monde (Audicana *et al.*, 2002).

La forme gastrique aiguë se produit lorsque la larve L3 est ingérée vivante. Celle-ci pénètre alors la couche muqueuse ou sous-muqueuse de l'estomac. Les symptômes apparaissent au bout de quelques heures, en moyenne 1 à 12 h après l'ingestion (Pravettoni *et al.*, 2012). Cette forme clinique se caractérise par un syndrome pseudo-ulcéreux et par des douleurs épigastriques, des nausées et des vomissements. Il peut y avoir d'autres symptômes moins fréquents comme des ballonnements abdominaux, de la diarrhée, de la fièvre, une hématurie. Ces symptômes peuvent disparaître en quelques jours mais peuvent parfois s'installer dans la chronicité (Pravettoni *et al.*, 2012). La quantité de cellules éosinophiles sur le lieu de l'infection ou de la lésion peut provoquer une modification de la muqueuse stomacale (éosinophilie). Trois types de lésions ont été décrites sur le site de pénétration de la larve : (a) tumor-like ou vanishing tumor, lésion caractérisée par la présence de la larve au centre d'une protubérance ; (b) swollen-fold, quand la larve pénètre un pli muqueux œdémateux et (c) flat lorsqu'il n'y a pas de modification de la couche muqueuse. Cette forme peuvent devenir chronique (Miliotis et Bier, 2003).

La forme intestinale aiguë se traduit par un syndrome pseudo-occlusif à cause de l'apparition d'un granulome à éosinophiles accompagné de douleurs abdominales, de nausées, de vomissements, de ballonnements abdominaux, de constipation et/ou de diarrhée. Il peut y avoir une infection bactérienne secondaire qui se traduit par de la fièvre à 38°C. La lésion apparaît souvent au niveau de l'iléon. Les symptômes apparaissent entre moins de 12 h à plus de 5 jours après le repas (Augry, 2012).

La forme gastrique chronique est caractérisée par des symptômes sub-aigus ou chroniques qui se traduisent par des douleurs épigastriques sévères, une dyspepsie, des vomissements et une anorexie pendant 5 à 7 jours (Pravettoni *et al.*, 2012). Ces symptômes peuvent persister des mois voire même des années après avoir ingéré la larve (Miliotis et Bier, 2003 ; de Pécoulas *et al.*, 2014). La hausse du taux d'IgE est caractéristique de la présence d'éosinophilie (Kennedy et Harnett, 2013) ce qui est plus commun dans la forme gastrique (Hochberg et Hamer, 2010 ; Pravettoni *et al.*, 2012).

La forme intestinale chronique se caractérise par des modifications granulomateuses (diagnostiqués à tort comme des tumeurs) qui provoquent un épaissement de la paroi intestinale, une sténose luminale, et des symptômes abdominaux chroniques (Miliotis et Bier, 2003 ; de Pécoulas *et al.*, 2014). Si un granulome à éosinophiles apparaît, l'élimination est nécessaire afin d'éviter une

sub-occlusion (Pravettoni *et al.*, 2012). En 2012, Pravettoni a détaillé qu'au bout de 4 heures à 6 jours après ingestion de la larve, celle-ci pénètre dans la couche muqueuse en excréant une protéase. Ceci provoque une réponse immunitaire de l'hôte, induisant la formation d'un granulome à éosinophiles. Après 7 à 14 jours, il y a une forte douleur de la lésion. Après 14 jours, la larve meurt mais la douleur due à la lésion est encore persistante. Une réaction allergique peut se manifester si la personne a été sensibilisée aux antigènes d'*A. simplex* antérieurement (Pravettoni *et al.*, 2012).

- Forme oesophagienne et digestive rares

Ces formes cliniques sont de faible incidence de l'ordre de 28 sur 11 989 cas rapportés en 1991 dans la région de Kyushu au Japon (Urita *et al.*, 1997). Les larves migrent de l'estomac vers l'œsophage ce qui provoque un picotement dans la gorge (*tingling throat*) qui induit un vomissement brutal, des douleurs rétro-sternales et un pyrosis qui dure plusieurs jours. Les larves sont souvent expulsées par la toux (Dupouy-Camet *et al.*, 2014 ; Jofré *et al.*, 2008) ou excrétées *via* les fécès (Maggi *et al.*, 2000).

- Forme ectopique ou extra-gastro-intestinale

Cette forme clinique est due à la perforation complète de la paroi gastro-intestinale par la larve de nématode qui atteint la cavité abdominale et d'autres organes. Dans ce cas, les symptômes cliniques sont de faible intensité même si la douleur intestinale peut être sévère à cause de la perforation. Plus rarement, les nématodes peuvent atteindre le colon, le caecum, la valvule iléo-caecale, l'appendice et le rectum (Cespedes *et al.*, 2000 ; Ishiguro *et al.*, 2001). En Corée, le premier cas d'atteinte extra-gastro-intestinale a été rapporté en 1997 dans les ganglions lymphatiques (Hee-Jung *et al.*, 1997). Le premier cas d'atteinte ectopique près de l'utérus a été rapporté aux Etats-Unis (Ramanan *et al.*, 2013).

- Forme allergique

Les formes allergiques dues à *Anisakis* et survenant dans la population générale restent rares (Pravettoni *et al.*, 2012). Elles touchent les personnes sensibilisées à des allergènes d'*A. simplex*. Il existe 3 types d'allergènes : somatiques, cuticulaires et sécrétés/excrétés (Pravettoni *et al.*, 2012). Les protéases, molécules allergènes sécrétées/excrétées permettent aux parasites de pénétrer dans l'organisme de l'hôte en phase d'invasion. Ces antigènes ne sont présents que chez les larves L3. Actuellement, pour *A. simplex*, il y a environ 15 allergènes connus dont 12 ont été nommés de Ani s1 à Ani s12. Parmi ces douze molécules, neuf protéases ont été caractérisées : 7 sont sécrétées/excrétées (Ani s1, 4, 5, 6, 7, 8 et 9) et 2 sont somatiques (Ani s2 et 3) (Pravettoni *et al.*, 2012). L'allergène majeur Ani s 7 est reconnu par le test IgE dans 100 % des cas dans le modèle

animal (rat) (Anadón *et al.*, 2009). Ceci peut être intéressant pour la faciliter le diagnostic de l'allergie à *A. simplex* chez l'humain.

La forme gastro-allergique est associée à des symptômes gastro-intestinaux et à une réaction allergique. Elle est causée par l'infestation par des larves d'*A. simplex* vivantes. Les symptômes apparaissent très tôt, une heure après le repas infestant (Gómez *et al.*, 2008) et comprennent l'urticaire, le purit, l'angioedème, le bronchospasme et, plus rarement, le choc anaphylactique (Audicana et Kennedy, 2008 ; Cuende *et al.*, 1997). Les allergènes de type sécrété/excrété, produits par la larve lors de la pénétration de la paroi stomacale ou intestinale de l'hôte, sont responsables de ces réactions. Les symptômes persistent moins de 24 heures mais l'intensité des douleurs abdominales dépend de l'état de la lésion (Efsa, 2010). Les différents tissus ou systèmes peuvent être atteints : la peau, les systèmes respiratoire, digestif et cardiovasculaire (De Pécoulas *et al.*, 2014). Au Japon, 10% des 72 cas examinés entre 1977 et 1985 présentaient un urticaire mais en France, ce taux était de 21 % sur les 29 cas examinés en 1991 (Ishikura, 1989 et Petithory, 1991 cités par de Pécoulas *et al.*, 2014).

L'allergie à *A. simplex* ne nécessite pas l'ingestion d'*A. simplex* mais se développe si une personne est sensibilisée aux antigènes d'*A. simplex*. Le contact avec l'antigène peut se faire par voie cutanée, par ingestion (Audicana et Kennedy, 2008 ; Park *et al.*, 2011) ou par inhalation comme cela a été mis en évidence dans un modèle murin (Park *et al.*, 2011). Des symptômes aigus tels que l'urticaire associé à un angioedème, un bronchospasme voire un choc anaphylactique apparaissent et peuvent conduire à la mort du patient. Cette allergie à *A. simplex* est considérée comme une maladie professionnelle car de nombreux professionnels de la filière pêche sont exposés aux allergènes. Une étude réalisée sur 578 manipulateurs de poisson en Afrique du Sud a montré que 8 % étaient sensibilisés aux antigènes d'*A. simplex* et produisaient des IgE. Ce pourcentage est plus élevé que le nombre de personnes étant sensibilisées aux allergènes de poisson (6 %) (Nieuwenhuizen *et al.*, 2006). De même, sur 94 sujets recrutés dans le secteur de la pêche en Sicile orientale, 20,2 % de la population présentaient des IgE dirigés contre *A. simplex*. La proportion était 6,7 fois plus élevée chez les pêcheurs et marins par rapport aux employés de l'industrie du poisson (Mazzucco *et al.*, 2012).

La forme chronique s'observe chez les patients sensibilisés même si le poisson est consommé cuit (de Pécoulas *et al.*, 2014). Ceci est dû à la thermostabilité de certains des allergènes. Une expérience *in vivo* par un test immunoblot sur le sérum de 8 patients a mis en évidence des réactions de sensibilisation aux allergènes d'*A. simplex* suite à la consommation de viande de poulet nourri par des farines contenant des poissons infectés par *A. simplex* (Armentia *et al.*, 2006). Des études (Audicana *et al.*, 1997 ; Moneo *et al.*, 2005) ont montré que la consommation des poissons en boîte de conserve peut induire une réaction allergique due à l'antigène Ani s4 d'*A. simplex* résistant à la

chaleur après une cuisson. Cet allergène est responsable de la sensibilisation de certains patients (Moneo *et al.*, 2005). Cela veut dire que les produits de la pêche, même bien cuits, peuvent présenter un risque. Un autre travail a mis en évidence que les antigènes extraits d'*A. simplex* résistaient à la digestion artificielle par la pepsine et/ou à une incubation de 30 min dans l'eau bouillante (Caballero et Moneo, 2004). Effectivement, les antigènes Ani s1 et Ani s 4 présents sur des larves d'*A. simplex* mortes peuvent poser un problème aux personnes sensibilisées (Audicana *et al.*, 2003). Ceci est en concordance avec une étude de 2008 qui a mis en évidence la présence de résidu d'allergène Ani s4 actif d'*A. simplex* après cuisson au micro-onde et digestion pepsique de produits de la pêche préalablement congelés à -20°C pendant 48 h (Vidaček *et al.*, 2009). Baeza *et al.*, (2005) ont montré que l'injection intra-veineuse d'antigènes extraits d'*A. simplex* a induit l'anaphylaxie et la production d'histamine chez le rat alors que l'ingestion de l'antigène n'a eu aucun effet. Ceci peut être due à la destruction de l'antigène par le suc digestif (Baeza *et al.*, 2005). Pour *A. simplex*, un seul parasite est suffisant pour induire la sensibilisation d'un individu (Lorenzo *et al.*, 2000).

L'anisakidose et l'allergie à *Anisakis* peuvent être classées et résumées en fonction de la localisation des signes cliniques (Tableau V).

Tableau V : Différentes formes cliniques de l'Anisakidose classées par la localisation des signes cliniques chez l'hôte accidentel : formes gastrique, intestinale, ectopique, oesophagienne et allergique à *A. simplex*.

Anisakidose classée par localisation des signes cliniques					
	Gastrique	Intestinale	Ectopique	oesophagienne	allergique à <i>A. simplex</i>
Délai d'apparition des symptômes	de 1 à 12 h(en moyen 2 à 5 h)	de 12 h à plus de 5 jours	2 - 4 semaines	1 à 10 jours	de quelques minutes à 24h
Principaux symptômes aigus	syndrome pseudo-ulcéreux : douleur épigastrique, nausées, vomissements et/ou diarrhée	syndrome pseudo-occlusif: douleurs abdominales, vomissements, nausées, diarrhée/ constipation	vomissements, fièvre, symptômes intestinaux : douleurs abdominales sévères, leucocytose, gastrite	vomissements brutaux, douleur rétrosternale	Anisakiose gastro-allergique (lares vivantes) ou allergie à <i>A. simplex</i> (larves vivantes ou mortes) : prurit, urticaire, angioedème, asthme, choc anaphylactique plus ou moins nausées, vomissements dans les formes gastro-allergiques
Principaux symptômes Chroniques	troubles dyspeptiques, vomissements, signes évoquant une sténose du pylore	subocclusif, douleur sourde non spécifique	-	pyrosis	urticaire
Diagnostic	anamnèse, endoscopie (± identification du parasite), sérodiagnostic(IgE)	anamnèse, sérodiagnostic (IgE), radiographie, anatomopathologie	sérodiagnostic (IgE), histopathologie, imagerie	endoscopie	anamnèse, sérologie (tests cutanés, IgE)
Diagnostic différentiel	ulcère gastrique, tumeur/cancer gastrique, intoxication alimentaire, cholécystite, cancer pancréatique	occlusion intestinale, appendicite, diverticulite, maladie de Crohn, iléite, colite ischémique, péritonite, iléus, intussusception, tumeur intestinale, tuberculose intestinale	Cholécystite	-	allergie au poisson, réactions croisées : autres nématodes, Ascaris, Insectes, Crustacés
Traitement	endoscopie	conservateur (chirurgie si complication)	endoscopie, histopathologie, imagerie	endoscopie et retiré par des épingles	évitiction + anti-histaminiques, corticoïdes, bronchodilatateurs, adrénaline

III.2. Diagnostic et traitement

Une seule larve d'*Anisakis* suffit à déclencher l'anisakidose, la réaction allergique ou les deux et il est rare d'observer des cas d'infection multiple (Noboru et Hiroshi, 1992). Pour diagnostiquer l'anisakidose et la réaction allergique, plusieurs méthodes peuvent être utilisées seules ou en combinaison.

L'interrogatoire : d'abord, la notion de consommation de produits de la pêche crus ou cuits est importante dans cet examen. Cet interrogatoire permet de déterminer l'examen qui sera le plus approprié (Pravettoni *et al.*, 2012). **L'imagerie médicale** peut être utilisée et permet, grâce à l'endoscopie, d'examiner les cas de gastrite aiguë. L'endoscope permet d'extraire le parasite après avoir effectué l'identification en utilisant la caméra (De Pécoulas *et al.*, 2014). La radiographie peut aider également pour la recherche des parasites dans les zones contournées de l'intestin, en particulier dans l'intestin grêle (Oshima, 1987 ; Sakanari et McKerrow, 1989). **L'anatomo-pathologie** permet d'examiner les coupes histologiques de tumeur infectée (De Pécoulas *et al.*, 2014). **Le bilan sanguin**, permet de mettre en évidence la présence d'Anisakidae et / ou d'allergènes d'*A. simplex* chez le patient. L'élévation du nombre d'éosinophiles dans le sang (hyperéosinophilie sanguine) est le signe d'une anisakidose chronique (Tanaka et Torisu, 1978). Il est également possible de quantifier et de caractériser l'allergène à partir du sérum du patient : c'est le test de radio-immunologie permettant de quantifier la molécule recherchée de façon très précise. Le résultat est considéré positif si le taux d'IgE est supérieur à $> 0,7 \text{ kUI}^{-1}$ (Audicana *et al.*, 2002). Pour mesurer le taux d'anticorps sériques dirigés contre les Anisakidae, la méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est très utilisée (Puente *et al.*, 2008). Dans le test ELISA, des réactions croisées sont possibles entre deux nématodes génétiquement proches ou entre des allergènes provenant d'autres organismes ou composés allergisants. Dans ce cas, l'immunoblot est conseillé afin de distinguer les réactions croisées (De Pécoulas *et al.*, 2014). Le *prick test* ou test cutané est un test explorant la réaction allergique cutanée et impliquant les IgE. C'est le test de première intention du bilan allergologique : si la papule mesure plus de 5 mm de diamètre, le test est positif (De Pécoulas *et al.*, 2014). Les questionnaires posés aux patients sur des aliments consommés et le *prick test* peuvent être un complément ou une confirmation avant d'effectuer un autre examen de sérologie tel que la recherche d'IgE dirigées contre des protéines de poisson, d'*A. simplex* etc... (Audicana *et al.*, 2002 ; Pravettoni *et al.*, 2012).

Le diagnostic différentiel est important également, puisque les symptômes d'anisakidose peuvent être confondus avec ceux d'un ulcère gastrique, une tumeur ou un cancer gastrique, une intoxication alimentaire, un cancer pancréatique, une appendicite, une maladie de Crohn, une obstruction intestinale (iléus), une tuberculose intestinale, une cholécystite (Sakanari et McKerrow, 1989). La

forme allergique peut être confondue avec l'allergie au poisson (Augry, 2012). Les résultats de ces tests peuvent être difficiles à interpréter, étant donné que certains tests bruts présentent des réactions croisées avec d'autres parasites, y compris les espèces d'*Ascaris*, *Toxocara canis* etc.. (Hochberg et Hamer, 2010). Dans une étude de Sakanari et McKerrow (1989), plus de 60 % des cas d'Anisakidose ont été diagnostiqués comme étant des cas d'appendicite, des cancers intestinaux ou des maladies de Crohn.

Pour le traitement, il est recommandé d'utiliser des corticostéroïdes pour diminuer l'inflammation causée par ces parasites (Chord-Auger *et al.*, 1995). En cas de symptômes allergiques ou de forme gastro-allergique, l'utilisation de l'endoscopie ou l'intervention chirurgicale peuvent être utilisées en association avec un traitement par adrénaline, corticoïde et anti-histaminique complété d'un traitement antiparasitaire tel que l'albendazole, le flubendazole ou le mébendazole (De Pécoulas *et al.*, 2014 ; Del Pozo *et al.*, 1997). En France, un cas de choc anaphylactique dû à *A. simplex*, découvert par l'examen sérologique, a été traité par l'albendazole (10 mg/kg/j pendant 7 jours) (Magnaval *et al.*, 2002). Une étude *in vitro* sur l'efficacité de l'albendazole contre *A. simplex* a montré une efficacité maximale de la drogue à 500 µg.mL⁻¹, concentration à laquelle 12 larves sur 15 ont été tuées en 48 heures mais l'acidité (pH 2) diminue considérablement l'efficacité de l'albendazole (Arias-Diaz *et al.*, 2006).

III.3. Épidémiologie de l'Anisakidose

Le premier cas d'Anisakidose gastro-intestinale, survenu à la suite d'une consommation de harengs chez l'Homme a été rapporté par Van Thiel en Hollande en 1960 (Augry, 2012). Depuis ce rapport, deux genres de nématodes ont été surveillés de plus près : *Anisakis* et *Pseudoterranova*. L'Anisakidose touche aussi bien l'Europe, l'Asie, l'Amérique, l'Afrique du Nord et l'océanie (De Pécoulas *et al.*, 2014). De nombreux cas d'Anisakidose ont été recensés dans les années 1950 et 1960 aux Pays-Bas, pays à forte consommation de poisson salé, fumé ou saumuré (Efsa, 2010). Dans le monde entier, 20 000 cas d'Anisakidose, dont 95 % déclarés au Japon, ont été rapportés (Audicana *et al.*, 2002). L'Anisakidose représente environ 2 000 cas par an au Japon, 50 aux Etats-Unis et 500 en Europe dont plus de 95 % sont rapportés aux Pays-Bas, en Allemagne et en Espagne (Audicana *et al.*, 2002). En France et aux Etats-Unis, les cas sont moins fréquents que dans les autres pays européens. Des cas humains d'Anisakidose ont été décrits un peu partout dans le monde selon les données rassemblées par Chord-Auger (1994). L'avis de l'Efsa de 2010 sur les parasites dans les produits de la pêche montre qu'au cours de ces 30 dernières années, le nombre de cas humains a augmenté ; ceci est dû à l'application de nouvelles techniques plus efficaces de détection des nématodes comme l'endoscopie (Oshima, 1987) et aussi, à la modification des habitudes alimentaires avec le développement de la consommation de plats crus ou peu cuits (McCarthy et Moore, 2000). En

Europe, la consommation de harengs (*Clupea harengus*) explique la majorité des cas (Mudry *et al.*, 1986). Mais ces données ne sont pas à jour. Plus précisément, en Espagne, l'Anisakidose est principalement due à la consommation d'anchois marinés (*Engraulis encrasicolus*), plat typiquement espagnol (*boquerones en vinagre*) et du merlu (*Merluccius merluccius*) du Sud de l'Espagne (Alonso-Gómez *et al.*, 2004). Aux Etats-Unis, l'Anisakidose est due plutôt à la consommation de saumon du Pacifique (*Onchorhynchus keta*) (Deardorff et Kent, 1989). Cette maladie touche les hommes aussi bien que les femmes d'âge moyen situé entre 30 et 50 ans mais aussi les âges extrêmes comme par exemple 13 ans (Van Thiel et Van Houten, 1967) et 75 ans (Sugimachi *et al.*, 1985).

En France, un système de surveillance systématique des cas d'Anisakidose n'existe pas (Institut de veille sanitaire, 2007). L'InVS (Institut de veille sanitaire), estime le nombre de cas à 8 par an. Ce nombre est sous-estimé et provient d'études datant des années 1980 (Institut de veille sanitaire, 2007). Quelques enquêtes épidémiologiques ont été conduites dans l'hexagone. Entre 1986 et 1993, 72 médecins gastro-entérologues sur les 80 présents en Loire-Atlantique ont répondu à l'enquête répertoriant les cas d'Anisakidose : 3 cas ont été confirmés et 3 autres cas ont été suspectés au vu de la sérologie et de l'histologie du granulome intestinal mais ces données n'ont pas été publiées (Chord-Auger *et al.*, 1995 ; Institut de veille sanitaire, 2007). En 1987, une enquête rétrospective sur les années 1985 - 1987 a été réalisée sous forme d'un questionnaire adressé aux 32 laboratoires hospitaliers de parasitologie et aux laboratoires pratiquant la sérologie de l'anisakidose sur toute la France (Hubert *et al.*, 1987). Cette étude a été initiée par la Direction Générale de la Santé et par le Ministère de l'Agriculture. Le nombre de cas a été rapporté 21 cas (pour 33 mois), soit 0,63 cas par mois ou 8 cas / an (Hubert *et al.*, 1987). Le PMSI (programme de médicalisation des systèmes d'information) a également permis l'enregistrement de 3 cas en 1997, 5 cas en 1998 et 11 cas en 1999 soit une moyenne de 6 cas hospitalisés par an (Institut de veille sanitaire, 2007). En revanche, aucun décès n'a été notifié entre 1995 et 1998 (Institut de veille sanitaire, 2007). Néanmoins, en 1994, une étude de cas (Bouree *et al.*, 1995) adossée à une étude de la littérature conduite par les hôpitaux Bicêtre, Cochin et de Gonesse a rapporté 25 cas en France dont 5 observations cliniques d'anisakidoses aiguës et 20 diagnostics sérologiques positifs. De plus, selon cette étude bibliographique, 55 cas ont été recensés en France. Parmi ces cas, une majorité présentait des symptômes aigus tels que des troubles épigastriques pour 18 cas, des douleurs abdominales (5 cas), un syndrome appendiculaire (3 cas). Les parasites ont été localisés dans la paroi gastrique chez 25 patients (Bouree *et al.*, 1995). La grande variété de symptômes qui peuvent être rencontrés rend difficile l'identification de l'Anisakidose et, pour cette raison, le nombre de cas en France est vraisemblablement sous-estimé. A ce jour 14 cas ont été rapportés entre 2010 et 2014 par les laboratoires de parasitologie-mycologie de France répartis en cinq cas de formes gastroduodénales,

une forme colique, une forme œsophagienne et 7 formes allergiques. La méthodologie utilisée pour étudier ces cas était comparable à celle de l'enquête de 1987 faites par Hubert *et al.* (1987). Cette étude récente a montré que le nombre de cas entre 2010 et 2014 était de 0,1 cas / mois alors qu'en 1985-1987, il était de 0,3 cas / mois (Azouzi-Touabet et Dupouy-Camet, Jean, 2015). Il est donc évident que le nombre de cas recensés en France diminue alors qu'il y a une augmentation de la consommation de poisson cru. En effet, le Frigaro a rapporté une augmentation de 25 % du chiffre d'affaires, entre 2011 et 2012, dans le secteur de la restauration « sushis » (Azouzi-Touabet et Dupouy-Camet, Jean, 2015). Ceci montre que les français connaissent et maîtrise le risque lié aux Anisakidae mais cette incidence est certainement sous évaluée (Azouzi-Touabet et Dupouy-Camet, Jean, 2015). En Espagne, depuis 1995, plus de 150 cas d'allergie dus à *A. simplex* ont été rapportés (Audicana *et al.*, 2002). En Italie, plus de 30 cas d'Anisakidose ont été rapportés en 2005 et les femmes semblent être plus touchées que les hommes (Pampiglione *et al.*, 2002 ; Pellegrini *et al.*, 2005). Mais le nombre de cas est également sous-estimé (Fumarola *et al.*, 2009).

Depuis 1967, Hokkaido semble être la ville la plus touchée (Oshima, 1987). En 1984, lors de la 27^{ème} réunion de la *Society of Digestive-tract Endoscopy*, 1 341 cas d'Anisakidose gastrique ont été rapportés au Japon (Oshima, 1987). Les cas d'Anisakidose ont été rapportés plus fréquemment dans les populations côtières proches de l'industrie des produits de la pêche (Asaishi *et al.*, 1980) cité dans Audicana *et al.*, 2002. Les espèces de poisson liées à l'Anisakidose et qui sont consommées au Japon, sont le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) et les calmars toutenon japonais (*Todarodes pacificus*). L'Anisakiose au Japon est causée principalement par *A. simplex* s.s à cause de sa capacité plus grande de pénétration dans le muscle en comparaison d' *A. pegreffii* (Suzuki *et al.*, 2010).

En Corée, quatre cas d'anisakiose gastrique chronique et de lésion granulomateuse stomacale ont été observés en 2006 (Kim *et al.*, 2006). Douze cas d'Anisakidose provoqués par le genre *Pseudoterranova* ont également été déclarés dans ce pays sur une période indéterminée (Na *et al.*, 2013). En 1991, un patient a été infesté par une larve L4 de *P. decipiens* (Sohn et Seol, 1994).

Au Chili, un autre cas d'Anisakidose gastrique a été causé par une larve de stade L4 de *P. decipiens* (Mercado *et al.*, 1997).

Goto *et al.*, (1990) ont montré que la population chinoise semble moins atteinte par l'Anisakidose. Ceci est probablement dû à la consommation de poisson cru à la fin du repas avec des condiments. De ce fait, les parasites ont moins de chance d'être en contact avec la paroi stomacale. En effet, des condiments tels que le gingembre (*Zingiber officinale*) ont montré un effet léthal à 100 % sur des larves. En effet, deux extraits de gingembre, le shogaol à 62.5 µg.mL⁻¹ ou le gingerol à 250 µg.mL⁻¹ ont un effet léthal de 100 % *in vitro* sur des larves d'Anisakidae (Goto *et al.*, 1990).

Les cas d'Anisakidose causés par *A. simplex* sont très rares dans les pays d'Afrique du nord, mais ceci peut être dû au fait que les cas soient non diagnostiqués et que la maladie soit autorésolutive (Farjallah *et al.*, 2006).

L'Anisakidose causée par *Pseudoterranova* est rarement rapportée au Japon. Elle est plutôt aux Etats-Unis et au Canada où *P. decipiens* est transmis par le cabillaud de l'Atlantique (*Gadus morhua*), le flétan du Pacifique (*Hippoglossus stenolepis*) et le vivaneau rouge (*Lutjanus campechanus*) (Audicana et Kennedy, 2008 ; Oshima, 1987).

Une expérience *in vivo* a montré qu'en insérant des larves L3 de *Contracaecum* spp. dans la cavité abdominale de rats, celles-ci ont survécu pendant plusieurs mois mais sans induire de pathologie (Deardorff et Overstreet, 1980). Une autre étude sur 2 porcs a montré qu'après 5 jours d'introduction par voie orale de 215 Anisakidae dans chaque porc, il restait seulement 12 larves d'Anisakidae dont 7 dans la femelle et 5 dans le mâle dans la couche mucosale. Au vu de ces 2 articles, même s'il y a pathogénicité de *Contracaecum*, elle semble plutôt faible (Strøm *et al.*, 2015).

III.4. Facteur de contamination

La forte prévalence et l'intensité des nématodes dans certaines espèces très consommées peuvent entraîner une réduction de la qualité du poisson (aspects répugnants) et ainsi une perte de parts de marché (Dorny *et al.*, 2009 ; Levsen et Lunestad, 2010). De plus, l'élimination des parasites représente un coût important pour les entreprises (Abollo *et al.*, 2001).

A ce jour, le nombre de cas d'Anisakidose semble être en hausse, et ce à cause de plusieurs facteurs. L'accroissement des populations de mammifères marins peut être un des facteurs (Afssa, 2008 ; Audicana et Kennedy, 2008). Mais le nombre de cas par an en France de 2010 à 2014 semble faible (Azouzi-Touabet et Dupouy-Camet, Jean, 2015).

Concernant les consommateurs, depuis une dizaine d'années, une augmentation de la consommation de poisson (92 g par jour par personne en France) a été observée, cela étant peut-être dû à la crise de la maladie de la vache folle (Audicana et Kennedy, 2008).

En outre, pour la France, il y a une recommandation du PNNS (Programme National Nutrition santé) de consommer du poisson au moins deux fois par semaine. L'augmentation de risque peut être également due à un développement des restaurants de sushi. En effet, au Japon ces restaurants servent des poissons haut de gamme et préparés par des personnes hautement compétentes ce qui n'est peut-être pas le cas dans certains pays (Sakanari, 1990).

Par ailleurs, une modification des habitudes culinaires en Europe, en Amérique et partout dans le monde est en cours (Afssa, 2008 ; Audicana *et al.*, 2002 ; Pravettoni *et al.*, 2012) avec de plus en plus

de préparations domestiques de plats à base de poisson cru (Oshima, 1987 ; Pravettoni *et al.*, 2012). Le développement de systèmes de cuisson rapide engendre le risque d'obtenir des produits insuffisamment cuits (Audicana et Kennedy, 2008).

IV. Impact des Anisakidae sur la filière pêche

IV.1. Données de consommation des produits de la pêche

Les poissons restent l'un des produits les plus échangés à l'échelle mondiale. Depuis 2012, l'aquaculture fournit près de la moitié des produits aquatiques destinés à la consommation humaine. La pêche et l'aquaculture assurent les besoins alimentaires de centaines de millions de personnes. Dans le monde, la consommation moyenne par personne était de 9,9 kg dans les années 1960 ; elle a atteint 19,2 kg en 2012. Certainement, les poissons sont une source importante de protéines (FAO, 2014). Le Tableau VI répertorie les tonnages des espèces et genres de poisson les plus pêchés en mer dans le monde en 2003, 2011 et 2012.

Le Tableau VI montre que, parmi les espèces les plus pêchées dans le monde en 2014, le hareng de l'Atlantique et le maquereau espagnol, poissons qui présentent une prévalence en Anisakidae élevée, se trouvent en 5^{ème} et 6^{ème} position. Plusieurs espèces de poisson, dont la prévalence en Anisakidae est assez élevée, sont également très pêchées (chinchard, cabillaud, maquereau commun *etc.*).

La consommation moyenne de poisson de la population française a été estimée à 23,6 kg/ personne/ an en 2014 (FranceAgriMer, 2015). La consommation de poisson est plus faible que prévu selon les recommandations du PNNS (Programme National de Nutrition et Santé). Ainsi, le PNNS conseille de consommer du poisson au moins deux fois par semaine. Les espèces de poisson les plus consommées en France sont présentées dans le Tableau VII, classées en fonction de la quantité consommée de 2008 à 2013. On note aussi en France une augmentation de la consommation des plats exotiques particulièrement à base de poisson cru ou insuffisamment cuit mais également des produits de la mer à base de poisson mariné, salé ou fumé (Afssa, 2004). L'application de la méthode HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) dans l'industrie agroalimentaire pour les produits de la filière pêche et le développement des procédures permettrait d'améliorer la qualité du produit et de mettre en place des traçabilités facilitant l'enquête lorsqu'il y a un éventuel cas lié aux Anisakidae (Butt *et al.*, 2004).

Tableau VI : Tonnages, pour les années 2003, 2011 et 2012, des espèces et genres de poisson marin les plus pêchés dans le monde selon le rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (*Food & Agriculture Organization, (FAO, 2014)*).

Classement 2012	Nom scientifique	Nom français en usage à la FAO	Variation				
			2003	2011	2012	2003-2012 (Pourcentage)	2011-2012
			(Tonnes)			(Pourcentage)	
1	<i>Engraulis ringens</i>	Anchois du Pérou	6 203 751	8 319 597	4 692 855	-24,4	-43,6
2	<i>Theragra chalcogramma</i>	Lieu de l'Alaska	2 887 962	3 207 063	3 271 426	13,3	2,0
3	<i>Katsuwonus pelamis</i>	Listao	2 184 592	2 644 767	2 795 339	28,0	5,7
4	<i>Sardinella spp.</i> ¹	Sardinelles nca	2 052 581	2 344 675	2 345 038	14,2	0,0
5	<i>Clupea harengus</i>	Hareng de l'Atlantique	1 958 929	1 780 268	1 849 969	-5,6	3,9
6	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	1 825 130	1 715 536	1 581 314	-13,4	-7,8
7	<i>Decapterus spp.</i> ¹	Comètes nca	1 438 905	1 384 105	1 441 759	0,2	4,2
8	<i>Thunnus albacares</i>	Albacore (= thon à nageoire jaune)	1 498 652	1 239 232	1 352 204	-9,8	9,1
9	<i>Engraulis japonicus</i>	Anchois japonais	1 899 570	1 325 758	1 296 383	-31,8	-2,2
10	<i>Trichiurus lepturus</i>	Poisson-sabre commun	1 249 408	1 258 389	1 235 373	-1,1	-1,8
11	<i>Gadus morhua</i>	Morue de l'Atlantique	849 015	1 051 545	1 114 382	31,3	6,0
12	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commune	1 052 003	1 037 161	1 019 392	-3,1	-1,7
13	<i>Mallotus villosus</i>	Capelan	1 143 971	853 449	1 006 533	-12,0	17,9
14	<i>Dosidicus gigas</i>	Encornet géant	402 045	906 310	950 630	136,4	4,9
15	<i>Scomberomorus spp.</i> ¹	Thazards nca	702 010	918 495	914 591	30,3	-0,4
16	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	689 606	945 452	910 697	32,1	-3,7
17	<i>Strangomera bentincki</i>	Hareng araucian	304 048	887 272	848 466	179,1	-4,4
18	<i>Acetes japonicus</i>	Chevrette akiami	542 974	550 297	588 761	8,4	7,0
19	<i>Brevoortia patronus</i>	Menhaden écailléux	522 195	623 369	578 693	10,8	-7,2
20	<i>Nemipterus spp.</i> ¹	Cohanas ncai	636 644	551 239	576 487	-9,4	4,6
21	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	620 200	607 118	489 297	-21,1	-19,4
22	<i>Trachurus murphyi</i>	Chinchard du Chili	1 797 415	634 126	447 060	-75,1	-29,5
23	<i>Sardinops caeruleus</i>	Pilchard de Californie	633 554	639 235	364 386	-42,5	-43,0
Total des 23 principales espèces / principaux genres			33 095 160	35 424 458	31 671 035	-4,5	-10,7
Total mondial			79 674 875	82 609 926	79 705 910		
Part des 23 principales espèces / principaux genres (pourcentage)			41,5	42,9	39,7		

Note: nca = non compris ailleurs.
¹ Les prises des espèces uniques ont été ajoutées à celles enregistrées pour le genre.

Les plats exotiques qui ont souvent été impliqués dans l'infection par les Anisakidae dans le monde sont les sushi et sashimi (tradition culinaire japonaise), le hareng salé ou fumé (tradition danoise et hollandaise), le gravlax (tradition scandinave), le lomi-lomi (tradition hawaïenne), le

ceviche (tradition d'Amérique latine), les anchois marinés (boquerones al vinagre, tradition espagnole) (Audicana *et al.*, 2003), les rollmops d'Allemagne (Klimpel et Palm, 2011).

Tableau VII : Espèces de poisson les plus consommées en France de 2009 à 2014. (FranceAgriMer, 2015)

Volume (tonnes)	2009	2010	2011	2012	2013	2014	%14/13
POISSONS FRAIS	142 494	135 689	128 973	133 762	128 189	124 755	-2,7%
Cabillaud	17 963	18 345	17 384	18 981	21 655	23 385	8,0%
Saumon	29 909	27 150	25 760	33 594	27 081	23 261	-14,1%
Lieu noir	8 378	7 980	7 089	7 273	8 181	7 449	-9,0%
Truite	5 357	4 978	3 946	4 144	4 443	5 362	20,7%
Merlan	5 307	5 558	5 409	5 161	5 352	4 857	-9,2%
Maquereau	4 943	4 681	4 188	4 332	4 371	4 780	9,4%
Merlu / Colin	5 514	5 511	5 782	5 103	4 847	4 450	-8,2%
Baudroie (lotte)	4 497	4 511	4 175	4 781	3 937	4 176	6,1%
Dorade	6 086	5 409	4 515	4 328	4 368	4 175	-4,4%
Sardine	4 316	3 883	4 157	3 547	3 559	4 168	17,1%
Sole	3 886	3 425	3 567	3 399	3 527	3 515	-0,3%
Bar / Loup	5 057	5 523	4 550	3 784	3 514	3 364	-4,3%
Julienne	2 692	3 138	3 374	2 809	3 110	3 184	2,4%
Raie	4 224	3 280	3 123	2 927	2 617	3 012	15,1%
Eglefin	2 032	2 347	2 642	3 547	2 992	2 250	-24,8%
Limande	1 729	1 994	1 680	1 474	1 596	1 902	19,2%
Plie	934	1 081	1 334	1 522	1 391	1 744	25,4%
Thon	1 989	1 533	1 511	1 467	1 737	1 744	0,4%
Saumonette	1 875	1 723	2 180	2 150	1 843	1 662	-9,8%
Lieu jaune	1 588	1 624	1 438	1 253	1 326	1 478	11,5%
Perche	3 021	2 185	2 244	1 972	1 599	1 138	-28,8%
Rouget barbet	1 047	1 374	1 365	1 115	870	1 133	30,2%
Autres poissons	14 063	13 088	13 175	10 828	9 989	8 436	-15,5%

Dans le Tableau VII, les 5 premières espèces les plus consommées en France sont le cabillaud, saumon, le lieu noir et la truite (FranceAgriMer, 2015). A part le saumon et la truite qui sont issus de l'élevage, les autres espèces et quelques autres comme le maquereau et la baudroie, peuvent être porteuses d'Anisakidae avec une prévalence assez élevée (Tableau III, IIIb, IIIc et IIId).

IV.2. Méthodes de maîtrise du risque et élimination parasitaire dans les produits de la pêche

IV.2.1. *Eviscération précoce*

Pour certaines espèces de poisson comme le cabillaud, les professionnels savent qu'il faut éviscérer le poisson à bord. Ceci éviterait la migration des larves d'Anisakidae vers la chair, partie consommée du poisson. La migration des parasites après la mort du poisson a été observée mais ce phénomène est controversé (Augry, 2012). Par ailleurs, le rejet des viscères parasités à la mer augmente l'abondance des parasites dans les autres poissons ou mammifères marins qui peuvent s'en nourrir (Abollo *et al.*, 2001).

IV.2.2. *Inspection visuelle*

Cette méthode permet d'inspecter les poissons entiers ou leurs filets ou organes à la recherche de parasites. Pour être efficace, cette méthode nécessite une personne qualifiée avec de l'expérience et de bonnes conditions d'éclairage compatibles avec l'œil humain afin de ne pas l'éblouir. La méthode

est sensible sous certaines conditions telles que l'aspect de la chair de poisson, l'épaisseur du filet, la présence ou l'absence de peau, le taux de matières grasses et l'expérience de l'examineur (Augry, 2012 ; Efsa, 2010). Les parasites, qui se situent profondément dans le muscle, ne pourront pas être détectés. Selon Huang (1990), l'efficacité de la méthode visuelle est bonne pour les espèces de poisson dont la chair est claire mais pour d'autres espèces, l'inspection visuelle est insuffisante pour ôter tous les parasites présents dans les filets. Cette méthode n'affecte pas la qualité du filet. L'inspection visuelle peut s'effectuer sur une table de mirage transparente munie d'un rétro-éclairage permettant de trans-illuminer le filet de poisson (Communauté européenne, 2005a). L'utilisation de la table de mirage est une technique dont le coût d'investissement est bas mais elle reste fastidieuse pour l'œil de l'opérateur. Un système de table de mirage intelligent a été mis au point pendant le programme *Fish-Parasites*. C'est une table de mirage associée à une caméra permettant une meilleure vision des contrastes et permettant la reconnaissance de la forme des larves de parasites. Pour l'instant, ce système nécessite encore des développements avant d'être opérationnel en contexte industriel. En Norvège, un système de détection des parasites en ligne, qui fonctionne à une vitesse de 40 cm par seconde et utilise un système d'éclairage hyperspectral (une technologie permettant la représentation d'une image suivant un grand nombre de bandes spectrales de plus d'une centaine d'images), a été développé par l'entreprise Nofima. Ce système fonctionne très bien pour l'instant sur les filets de cabillaud avec ou sans peau (Sivertsen *et al.*, 2012).

IV.2.3. Découpe

L'élimination des parasites peut aussi se faire pendant la découpe du poisson, soit à bord pendant l'éviscération, soit pendant le filetage soit pendant le processus de transformation. A ce moment-là, les parasites peuvent être retirés manuellement. Mais l'élimination manuelle des parasites peut abîmer la chair du poisson. Si la charge parasitaire est trop élevée pour l'élimination à la main, une autre méthode peut être appliquée : le parage. Le parage permet d'éliminer différentes parties plus ou moins étendues du filet de poisson (Figure 16). Si l'on considère la répartition probabiliste des parasites dans le filet, le parage au niveau D semble être le plus efficace pour s'affranchir du plus grand nombre de parasites mais cette découpe génère également une perte économique importante pour l'industriel.

Le filetage manuel et le filetage mécanique ont été comparés dans une étude sur la distribution d'*A. simplex* dans le hareng capturé en Norvège. Les filets obtenus par la méthode mécanique présentaient une prévalence d'*A. simplex* 5 à 8 fois plus basse que ceux obtenus par le filetage manuel (Levsen et Lunestad, 2010). Mais le filetage mécanique enlève la partie flanc (partie fréquemment contaminée) alors que la méthode manuelle non. Une autre étude a montré que les

larves L3 d'*A. simplex* présentes dans le flanc représentaient 92 % du nombre total de parasites présents dans le muscle (Klapper *et al.*, 2015). La découpe peut être un bon moyen d'éliminer une bonne partie des parasites présents dans les filets de poisson.

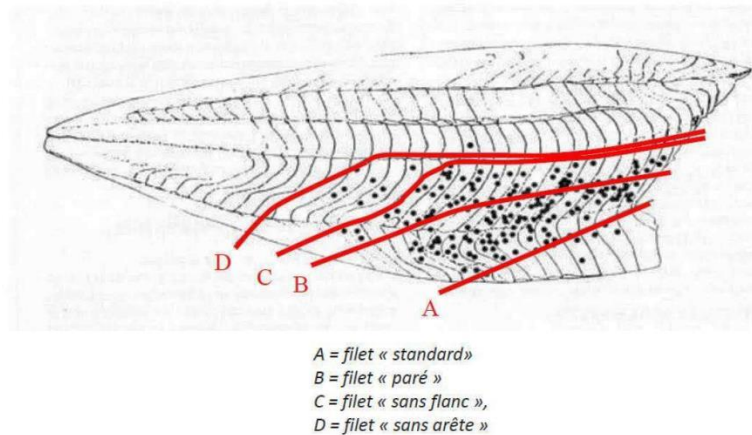


Figure 16 : Technique de parage d'un filet (Angot et Brasseur, 1995), les points noirs représentent la distribution théorique des kystes d'*Anisakidae*

IV.2.4. Ecrasement par presse hydraulique et observation sous lumière UV

La presse hydraulique permet l'écrasement de la chair ou des différents organes du poisson qui ont été préalablement congelés. La congélation rend les larves de parasites fluorescentes sous la lumière ultra-violette à une longueur d'ondes de 366 nm (Karl et Leinemann, 1993). Cette technique est très utilisée dans les études scientifiques mais ne peut l'être dans l'industrie car la chair est complètement détruite après la détection (Efsa, 2010 ; Levsen et Lunestad, 2010). La presse hydraulique n'est pas toujours compatible avec le devenir du filet dans l'industrie puisqu'elle détruit la forme du filet. Cela pourrait-être envisageable si la chair de poisson est utilisée sous forme de pâté, brandade, rillettes, etc. Cette technique peut être utilisée sur un échantillon d'un lot pour estimer la prévalence et l'intensité des parasites pour l'ensemble du lot.

IV.2.5. Digestion pepsique

La digestion pepsique permet d'isoler les nématodes de la chair de poisson ou des viscères. Les conditions de la digestion pepsique simulent l'environnement gastrique en utilisant une solution de pepsine et de l'acide chlorhydrique à pH 2. La préparation exacte est décrite dans la partie I.2 Protocole de dissection des poissons du Matériels et Méthodes. Cette méthode, destructrice pour la chair de poisson, a été décrite dans le *Codex alimentarius* comme une méthode de vérification du produit transformé (World Health Organization, 2003). Elle permet de détecter théoriquement 100 % des larves présentes dans le produit. En revanche, cette méthode est longue, coûteuse, peut

altérer la morphologie de la larve surtout si elle est déjà fragilisée par la congélation, voire même éliminer certaines larves abîmées (Efsa, 2010, Gay et al, communication personnelle).

IV.3. Règlements et prévention face au risque parasitaire

L'objectif de la prévention doit se baser sur la destruction et l'élimination puisqu'une hypersensibilisation due au contact avec le parasite mort, cuit ou congelé peut être observée. A ce jour, les réglementations existent pour certains pays dans lesquels la consommation de produits de la pêche est élevée et chaque pays possède sa propre réglementation. Pour l'Union Européenne, les autorités ont imposé plusieurs mesures de prophylaxie ; ce qui a permis une forte diminution du nombre de cas d'Anisakidose dans ces pays. Aujourd'hui, pour maîtriser le risque lié à la présence de ces parasites, les réglementations européennes imposent :

La réglementation européenne 853/2004 du Parlement Européen définit des « produits de la pêche » comme étant tous les animaux marins ou d'eau douce (à l'exception des mollusques bivalves, des échinodermes vivants, des tuniciers vivants et des gastéropodes marins vivants et de tous les mammifères marins, reptiles et grenouilles), sauvages ou d'élevage, y compris toutes les formes et parties comestibles de ces animaux.

RÈGLEMENT (CE) N°178/2002 : s'applique à toutes les denrées alimentaires et indique que les exploitants du secteur alimentaire doivent, à toutes les étapes de la production, de la transformation, de la distribution du produit, maîtriser le risque sanitaire par le respect des prescriptions réglementaires et la vérification du respect des prescriptions. Aucune denrée alimentaire dangereuse ne doit être mise sur le marché (denrées impropres à la consommation humaine ou préjudiciables à la santé) et ces exploitants ont une obligation de traçabilité à toutes les étapes pour la transparence et pour la maîtrise du risque en cas d'épidémie (Communauté européenne, 2002).

En 2004, l'Union européenne a instauré **le règlement (CE) N°852/2004** (Communauté européenne, 2004a) : *Les exploitants du secteur alimentaire ne doivent accepter aucun ingrédient ou matière autre que des animaux vivants, ou tout autre matériau participant à la transformation des produits, dont on sait ou dont on a tout lieu de supposer qu'ils sont contaminés par des parasites, des micro-organismes pathogènes ou des substances toxiques, décomposées ou étrangères, de manière telle que, même après que l'exploitant du secteur alimentaire a procédé normalement au triage et/ou aux procédures de préparation ou de transformation, le produit final serait impropre à la consommation humaine* ». Ce règlement augmente ainsi le niveau de contrôle à la réception du produit et oblige à l'élimination des parasites dès la réception pour garantir l'absence de parasites

dans le produit fini. Si le professionnel met en place le parage ou l'éviscération et qu'il s'assure de leur efficacité, il peut accepter des lots infestés.

La réglementation (CE) n°2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 (Communauté européenne, 2005b) concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires donne une définition du micro-organisme qui pourrait être un danger pour la consommation humaine comme suit :

Article 2 définition a) Sont définis comme « **micro-organismes** » : *les bactéries, les virus, les levures, les moisissures, les algues, les protozoaires parasites, les helminthes parasites macroscopiques, ainsi que leurs toxines et métabolites* ».

La réglementation européenne 2074/2005 de la commission du 5 décembre 2005 (Communauté européenne, 2005a) a fixé des éléments complémentaires par rapport aux réglementations (CE) n° 853/2004 et (CE) n°854/2004. Elle exige le contrôle visuel à toutes les étapes de la production des produits de la pêche à terre et à bord afin que le produit infecté par les parasites ne soit pas mis sur le marché. Les manipulateurs doivent donc s'adapter aux règlements sur la définition de parasite visible à l'œil, le contrôle et sa fréquence.

Le contrôle visuel doit être effectué par du personnel qualifié sur un nombre représentatif d'échantillons en fonction de la nature des produits de la pêche, de leur origine géographique et de l'usage auquel ils sont destinés. Par ailleurs, la réglementation européenne 2074/2005 définit les termes suivants dans la section I, chapitre I:

- parasite visible : tout parasite ou groupe de parasites ayant une dimension, une couleur ou une texture permettant de le distinguer nettement des tissus du poisson
- contrôle visuel : examen non destructif des poissons ou des produits de la pêche, exercé avec ou sans moyen optique d'agrandissement et dans de bonnes conditions d'éclairage pour l'œil humain, y compris par mirage si nécessaire
- mirage: dans le cas de poissons plats ou de filets de poisson, observation à contrejour du poisson éclairé par une source lumineuse dans une pièce sombre afin d'y détecter les parasites.

La réglementation européenne 853/2004 du Parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 (Communauté européenne, 2004b) insiste sur:

1. La nécessité d'un contrôle visuel pour la détection des parasites visibles : les produits manifestement parasités ne doivent pas être mis sur le marché ;

2. Les exploitants du secteur alimentaire qui mettent sur le marché les produits de la pêche suivants provenant de poissons à nageoires ou de mollusque céphalopodes :
 - Si les produits de la pêche destinés à être consommés crus ; ou les produits de la pêche marinés, salés et/ou ayant subi un autre traitement, si le traitement est insuffisant pour tuer les parasites viables, doivent veiller à ce que le produit cru ou fini soit soumis à un traitement de congélation de façon à tuer les parasites viables susceptibles de présenter un risque pour la santé des consommateurs.
3. Pour les parasites autres que les trématodes, toutes les parties du produit doivent être congelées à une température d'au moins :
 - a) La congélation assainissante obligatoire (-20°C pendant 24 heures en tous points du produit,
 - b) Ou à -35 °C pendant un minimum de 15 heures) pour les produits devant être consommés crus ou pratiquement crus
4. Les exploitants du secteur alimentaire ne doivent pas procéder au traitement de congélation visé au point 2 pour les produits de la pêche :
 - a) Qui ont subi, ou vont subir, un traitement thermique tuant les parasites viables avant d'être consommés. Dans le cas de parasites autres que les trématodes, le produit est porté à une température à cœur de 60 °C ou plus pendant au moins une minute.
 - b) Qui ont été conservés en tant que produits de la pêche congelés pendant un temps suffisamment long pour tuer les parasites viables ;
 - c) Issus de captures de poissons sauvages, pour autant :
 - i) Qu'il existe des données épidémiologiques indiquant que les lieux de pêche d'origine ne présentent pas de danger sanitaire en ce qui concerne la présence de parasites ; et
 - ii) Que l'autorité compétente l'autorise ;
 - d) Provenant de la pisciculture, élevés à partir d'embryons et exclusivement soumis à un régime alimentaire exempt de parasites viables susceptibles de présenter un risque sanitaire et qui satisfont à une des exigences suivantes ;
 - i) Ils ont été élevés exclusivement dans un milieu exempt de parasites viables ; ou
 - ii) L'exploitant du secteur alimentaire vérifie, au moyen de procédures approuvées par les autorités compétentes, que les produits de la pêche ne présentent pas de risque sanitaire au regard de la présence de parasites viables.
5. a) les produits de la pêche visé au point 2 doivent, lorsqu'ils sont mis sur le marché, sauf lorsqu'ils sont fournis au consommateur final, être accompagnés d'un document établi par

l'exploitant du secteur alimentaire procédant au traitement de congélation indiquant le type de traitement de congélation auquel ils ont été soumis.

- b) Avant de mettre sur le marché les produits de la pêche visés au point 4 c) et d) qui n'ont pas été soumis au traitement de congélation ou ne sont pas destinés à être soumis avant consommation à un traitement tuant les parasites viables présentant un risque sanitaire, un exploitant du secteur alimentaire doit veiller à ce que ces produits proviennent de lieux de pêche ou d'élevage satisfaisant aux exigences spécifiques mentionnées dans un de ces points. A cet effet, il veillera à faire figurer les informations requises dans le document commercial ou dans tout autre document joint aux produits de la pêche »

Dans la réglementation (CE) 854/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004

(Communauté européenne, 2004c), fixant les règles des contrôles officiels, il est indiqué :

- l'obligation d'effectuer des tests aléatoires pour vérifier le respect de la législation communautaire ;
- les produits sont déclarés impropres à la consommation humaine si non conformes à la législation communautaire pertinente (donc si présence de parasites visibles)

En 2010, la DGAL a lancé une opération « alimentation vacances ». Parmi les points de contrôle, il a été rappelé que la maîtrise du risque *Anisakis* passait par l'élimination des viscères de poisson dès la capture, la destruction de la larve d'*Anisakis* par la chaleur ou le froid en respectant la réglementation (CE) n° 853/2004 (DGAL/SDSSA/N2010-8179, 2010). Un autre point de contrôle concernait les traiteurs et les restaurateurs qui doivent s'approvisionner en produits de la pêche auprès de fournisseurs qui garantissent la maîtrise du risque parasitaire par une congélation adaptée à la consommation du poisson cru ou insuffisamment cuit. Par contre, les poissonniers et les responsables de rayon marée ne sont pas obligés de congeler les produits de la pêche mais ils doivent informer les consommateurs sur l'utilisation du produit vendu et comment préparer le produit si cela est destiné à la consommation cru/mariné *etc.*. Mais si leur produit est vendu en plat préparé ou transformé à base de produits de la pêche, la congélation est obligatoire (DGAL/SDSSA/N2011-8117, 2011). Pour sensibiliser à ce risque, une note d'information « Maîtriser le risque *Anisakis* dans les produits de la pêche » a été remise aux professionnels en 2010 (DGAL/SDSSA/N2011-8140, 2011). Cette note s'appuie également sur l'avis de l'Afssa (Agence nationale de sécurité sanitaires des aliments) du 22 avril 2008 (Afssa, 2008). Les produits de la pêche ne doivent pas être congelés s'ils sont issus d'une filière d'élevage garantissant la maîtrise du risque parasitaire (maîtrise du cycle d'élevage et de l'alimentation du poisson) (DGAL/SDSSA/N2012-8126, 2012).

Selon l'instruction technique émanant de la DGAL (DGAL/SDSSA/2014-576, 2014), les grands principes de la prévention du risque parasitaire sont l'interdiction de mise sur le marché des produits finis manifestement parasités, la recommandation d'exercer un contrôle visuel, le tri et le parage des filets pour autant que l'intensité d'infestation le permette à toutes les étapes et l'obligation d'appliquer un traitement de congélation avec un barème fixé pour certains produits destinés à la consommation sous forme de poisson cru ou insuffisamment transformé.

En 2007, lors de contrôles ciblés par les services vétérinaires, un manque de maîtrise du risque *Anisakis* dans les produits de la pêche a été constaté dans la restauration et la remise directe. Dans 43% des cas (129 cas sur 300 contrôles), aucune congélation assainissante n'était appliquée aux produits destinés à une consommation crue (DGAL/SDSSA/SDSPA/N2008-8145, 2008). Sur un contrôle de maîtrise du risque *Anisakis* dans les produits de la pêche chez les traiteurs et les restaurateurs, 99 étaient conformes (65 %) et 54 non conformes (35 %). La proportion de traiteurs/restaurateurs non conformes en 2010 a augmenté par rapport à 2007 puisqu'elle est passée à 80 % pour 276 inspections (DGAL/SDSSA/N2010-8295, 2010). Ceci montre un niveau important de non respect des réglementations par les restaurateurs.

Dans le cadre des inspections par les services vétérinaires (DGAL/SDSSA/2014-576, 2014) des mareyeurs, des établissements agréés manipulant des produits de la pêche, poissons et céphalopodes en particulier (inspections programmées ou pas pour les halles à marée, ateliers agréés de manipulation et transformation, etc.), mais aussi dans le cadre d'inspections prévues localement, notamment pour les navires non agréés et les ateliers de remise directe (rayon marée des supermarchés, poissonneries, restaurants et tout autre atelier non agréé), il est indiqué que :

- il est interdit de mettre sur le marché un produit fini destiné au consommateur manifestement parasité (présence raisonnablement détectable à l'oeil nu d'un ou plusieurs parasites, vivants ou morts) ; il est obligatoire de réaliser des contrôles visuels en tout lieu de la chaîne de production et un tri/parage/filetage associé pour autant qu'il soit possible ; il est obligatoire dans certaines circonstances, pour les produits destinés à être consommés crus ou non suffisamment transformés pour éliminer le risque parasitaire, d'appliquer un traitement de congélation avec un barème fixé (DGAL/SDSSA, 2014).

Selon l'Avis de l'Afssa, 2008, une dérogation est possible si les poissons d'élevage ont été nourris avec une alimentation strictement maîtrisée tout au long de leur vie. Une étude sur la recherche des larves d'*Anisakidae* dans 259 bars (*Dicentrarchus labrax*) et 612 dorades royales (*Sparus aurata*) issus d'élevage a été conduite dans 10 fermes de la région de Murcia sur la côte Méditerranéenne. L'inspection visuelle et la digestion pepsique a montré l'absence de larves d'*Anisakidae* (Peñalver et

al., 2010). Le risque de contamination des poissons d'élevage par les parasites Anisakidae est donc minime sauf s'ils sont nourris avec des organismes contenant des larves d'*Anisakis* vivantes (Wootton et Smith, 1975).

Aux Etats-Unis, dans le manuel « *Fish and Fishery Products Hazard and Controls Guidance* » édité par la FDA (*Food and Drug Administration*, 2014), le chapitre 5 (Parasites) permet aux restaurateurs, aux professionnels de la transformation des produits de la pêche d'évaluer le risque potentiel lié aux parasites présents dans les produits de la pêche tout au long de la chaîne de fabrication. Ceci a permis la détermination du CCP (*Critical Control Point* ou Point de contrôle critique) dans l'application de la méthode HACCP. Ce manuel donne des exemples de congélation efficace à différents couples durée/température :

- Congélation à - 20°C et stockage pendant 7 jours ;
- Congélation à - 35°C en tout point du produit puis stockage à - 35°C pendant 15 heures ;
- Congélation à - 35°C en tout point du produit puis stockage à - 20°C pendant 24 heures ;

Ces conditions sont efficaces pour tuer les nématodes si l'épaisseur du filet ne dépasse pas 15,24 mm. Sinon, les opérateurs doivent déterminer leur procédure pour les produits de plus de 15,24 mm d'épaisseur en respectant cette base (Food and Drug Administration, 2011).

Le *Codex alimentarius* (section 15) mentionne la procédure HACCP à respecter pour la transformation des céphalopodes : lors de la réception des céphalopodes, il faut rechercher la présence éventuelle d'*Anisakis* qui est un danger potentiel associés aux poissons, mollusques, crustacés et autres invertébrés aquatiques frais (World Health Organization, 2003).

De telles législations, détaillées ci-dessus, seraient inapplicables et culturellement inacceptables au Japon (Oshima, 1987). Au Japon, l'Anisakidose est un réel problème de santé publique (Bouree et al., 1995). Mais la plupart des cas sont dus à la consommation des plats contenant du poisson cru préparés à la maison et non au sushi bar car le restaurateur possède un savoir faire sur la manipulation du poisson (Oshima, 1987).

Malgré tout, et malheureusement, ces réglementations ne permettent pas d'atteindre le risque zéro pour l'Anisakidose et, de plus, elles ne peuvent pas protéger les consommateurs vis-à-vis du risque d'allergie dû à *A. simplex* (Pravettoni et al., 2012). Pour finir, il existe un choix alternatif : celui de consommer des produits issus de l'aquaculture, l'alimentation étant maîtrisée, le risque parasitaire est faible ou nul (Efsa, 2010).

IV.4. Impact des méthodes de conservation sur la viabilité des Anisakidae

IV.4.1. La résistance d'Anisakis à différentes conditions environnementales

Tableau VIII : Résistance des larves d'*Anisakis* sp. soumises à différents conditions environnementales : le froid, la chaleur, le sel, le suc gastrique, l'acide acétique et les condiments (Augry, 2012)

Paramètres environnementaux	Survie des L3	Référence
Froid		
4°C - 10°C	> 8 mois	a
2°C	< 50 jours	b
0°C	< 25 jours	a
-5°C	< 4 jours	a
-10°C	< 24 heures	a
-20°C (chez le Sébaste)	< 6 jours	a
Chaleur		
60°C	< 5 min	a
Sel (NaCl)		
sel sec	10 min	a
saumure saturée	24 heures	a
solution à 33%	8 jours	a
solution à 9%	4 semaines	c
solution à 4-4,5%	> 17 semaines	c
solution à 3-3,5%	Survie	d
Suc gastrique		
pH 1-1,5 à 37°C	> 10 jours	a
Acide acétique		
Vinaigre	51 jours	b
acide acétique à 2%	25 jours	b
Condiments		
Gingembre	< 17 heures	e
sauce soja	< 18 heures	e
wasabi(solution à 5% ou pâte commerciale)	< 2 heures	e

Références : (a) BOIREAU 2002, (b) CHANTOME 2004, (c) HUSS 1993, (d) FDA 2001, (e) JOFRE 2008

Le Tableau VIII récapitule les résultats de plusieurs études sur la résistance d'*Anisakis* sp. isolé du poisson soumis à différentes conditions environnementales (Augry, 2012). Face au froid, *Anisakis* sp. isolé du sébaste peut résister jusqu'à 6 jours à -20 °C ; par contre, il résiste moins de 5 min à 60 °C. Le sel sec est très efficace pour tuer des larves d'*Anisakis* sp. isolées en 10 minutes. Elles résistent pendant plus de 10 jours à des pH acides extrêmes compris entre 1 et 1.5, ce qui explique sa survie dans l'estomac humain. Il résiste également au vinaigre et à l'acide acétique à 2 % pendant 51 et 25 jours, respectivement. Parmi les condiments, le wasabi en solution à 5 % a un effet létal rapide sur *Anisakis* sp. en moins de 2 heures. Ces données peuvent être utiles en agroalimentaire pour définir les meilleures conditions permettant de prévenir le risque d'Anisakidose mais il faut prendre en compte la qualité organoleptique de produit après avoir appliqué ces conditions.

IV.4.2. Efficacité reconnue de la température sur les Anisakidae

- Congélation

Cette façon de conserver les aliments par le froid est également fiable pour tuer les parasites. Dans la réglementation mentionnée précédemment (IV.3 Règlements et prévention face au risque

parasitaire), certains couples durée / température de congélation permettent de tuer les Anisakidae. Le couple durée / température se définit en fonction de l'épaisseur et de la qualité (teneur en graisse) du produit à congeler. La FDA conseille une température de -20 °C pendant 7 jours ou -35 °C pendant 15 h. Le règlement européen 853/2004 impose une congélation à -20 °C pendant 24 h en tous points du produit. La congélation peut être appliquée à différentes étapes de la transformation du produit. Elle représente un CCP dans la méthode HACCP (Food and Drug Administration, 2011). Malgré cette efficacité pour tuer les larves, elle ne permet pas de détruire tous les antigènes produits par les larves d' *A. simplex* (Afssa, 2008 ; Augry, 2012).

- Cuisson

La cuisson permet de tuer les parasites et notamment les Anisakidae. La réglementation CE (Commission Européenne) préconise une cuisson à 60 °C pendant 1 min à cœur. Mais là aussi, l'application d'un certain couple temps / température est à moduler selon l'épaisseur du produit à cuire. Wootten et Cann (2001) ont montré que pour un filet d'épaisseur égale à 3 cm, il fallait une cuisson de 10 min à 60 °C pour tuer les larves (Afssa, 2008 ; Augry, 2012). Par contre, une autre étude indique que la cuisson au four traditionnel à une température de 85,7 °C - 86,1 °C pendant 3 min ou au four à micro-onde à 67,8 °C - 69,2 °C pendant 30 sec était suffisante pour tuer les larves d'*A. simplex* (Vidaček *et al.*, 2009). Mais il faut souligner qu'une personne sensibilisée aux allergènes d'*Anisakis* pourrait tout de même développer une réaction allergique après avoir consommé du poisson cuit. En effet, certains allergènes d'*Anisakis* ne sont pas dénaturés par la chaleur, ils sont thermostables et leur antigénicité est préservée (Vidaček *et al.*, 2009).

IV.4.3. Méthodes de transformation et de préservation des produits de la pêche

- Salage

Le salage est une façon de traiter le poisson avec du sel de qualité alimentaire permettant de diminuer l'activité d'eau (a_w) (Codex alimentarius, Codex STAN 311-2013, 2013) c'est-à-dire l'eau libre du produit pour mieux le stabiliser (par exemple morue salée, *Gadus morhua*). Il existe 3 types de salage : (1) le salage au sel sec en ajoutant le sel directement sur les poissons puis en les égouttant, (2) le salage en utilisant une saumure qui est préparée en mélangeant eau et sel dans certaines proportions ; on ajoute ensuite le poisson qu'on laisse incuber pendant un temps donné puis on égoutte le produit, (3) la méthode de salage par injection qui consiste à injecter de la saumure dans les différentes parties de la chair du poisson (Codex alimentarius, Codex STAN 167-1989, 1989).

Les larves d'Anisakidae ne meurent que dans certaines conditions de salage. Plusieurs organismes telles que l'Afssa, l'AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), MAPAQ (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Canada) et le CEVPM (Centre

d'Experimentation et de Valorisation des Produits de la mer, qui est devenu aujourd'hui PFI : Plateforme d'Innovations Nouvelles Vagues) ont formulé des recommandations afin d'utiliser les conditions suivantes qui permettent de tuer les parasites pendant le salage (Augry, 2012) :

Selon l'Afssa (2008) et selon l'étude effectuée par le CEVPM, pour le hareng, les conditions suivantes sont efficaces pour tuer les larves : soit 21 jours de contact avec du sel sec ou avec une saumure saturée, soit 21 jours de stockage en saumure, une fois atteint le taux de 20 % de sel dans la phase aqueuse des tissus de poisson ou 28 jours de stockage en saumure si le taux atteint est de 15 % (Afssa, 2008).

Selon l'AESAN, 2007 : il faut 6 semaines de stockage dans une solution de sel à 8-9 %.

Selon le MAPAQ, 2011 : Soit 21 jours d'entreposage en saumure si la teneur en sel atteint 20 % dans la chair de poisson, soit 28 jours d'entreposage si la teneur en sel atteint 15 % ou 35 jours d'entreposage si la teneur en sel atteint 12 % avec adjonction de sucre.

Les conditions données par l'AESAN, le MAPAQ sont valables pour toutes les espèces de poissons. Mais parmi les produits commercialisés, seuls les filets de morue salés séchés et certains harengs préparés sont fabriqués en respectant ces conditions (Afssa, 2008).

Dans l'avis de l'Afssa (2008) il est décrit que selon le *Codex alimentarius*, un règlement existe pour le salage des poissons de famille des *Gadidae* dont le taux de sel ne doit pas être moins de 12 % de saturation. La chair de poisson ne doit contenir aucune larve vivante de nématode. La viabilité des nématodes doit être vérifiée après avoir effectué la digestion pepsique du poisson. Sinon la congélation au préalable est conseillée pour tuer les larves de nématode (Codex alimentarius, Codex STAN 244-2004, 2004).

- Marinage

Selon l'Afssa, le marinage est une acidification du produit de la mer par contact avec une saumure légère (non saturée) et éventuellement aromatisée ou sucrée, acidifiée par le vinaigre ou un acide organique autorisé. La marinade peut être additionnée d'autres condiments comme l'huile d'olive, l'oignon, etc. Les produits marinés ne subissent pas de traitement thermique. Par rapport à la viabilité des larves d'Anisakidae, la méthode est plus ou moins efficace en fonction du taux de sel, de la concentration en vinaigre et du temps de marinage prévu dans la fabrication. Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a aucune recommandation publiée sur la fiabilité de cette méthode par rapport à la viabilité des Anisakidae (Afssa, 2008). Si la méthode de marinage n'est pas efficace pour tuer les larves, la réglementation prévoit une étape préalable de congélation du produit. La consommation d'anchois marinés dans le vinaigre est une source potentielle de danger pour les consommateurs sensibilisés

aux allergènes d'*Anisakis* puisque des larves mortes ont été retrouvées après une digestion pepsique d'anchois marinés dans le vinaigre depuis 10 jours (Solas *et al.*, 2009). Une étude a été réalisée sur le marinage de filets de harengs en testant la méthode danoise et allemande (Karl *et al.*, 1994). Les auteurs ont mis en évidence que la viabilité des Anisakidae dépendait de la relation entre le taux de sel, l'acidité et le temps de marinage. La méthode ne doit pas se baser sur la concentration d'acide acétique dans l'eau, mais de sel. Plus le taux de sel augmente, moins longue est la survie pour les Anisakidae. La méthode danoise permet de tuer les larves en 17 h à 12 °C avec 10 % de sel, en 6 semaines à 3 °C dans la marinade à 10 % de sel et 5 % d'acide acétique (ratio poisson/saumure 1,8 :1). La méthode allemande a permis de tuer la larve en 5 semaines à 3 °C dans la marinade de 14 % de sel et 7 % d'acide acétique et de peroxyde d'hydrogène (ratio poisson/saumure 1,5 :1). Mais le peroxyde d'hydrogène pour le marinage est interdit en France aujourd'hui (Afssa, 2008). Le taux de graisse dans le poisson influence l'efficacité de la marinade (plus de temps de marinage si le poisson est plus gras). A Madrid, la prévalence des cas d'Anisakidose est très élevée à cause de la consommation de *boquerones al vinagre* (anchois marinés au vinaigre) et de poisson frais (Puente *et al.*, 2008). Effectivement, la méthode de marinade traditionnelle des anchois, utilisée en Espagne, ne permet pas de tuer les larves d'*Anisakis*. D'après Sánchez-Monsalvez *et al.*, (2005), la mort de tous les parasites présents dans les filets d'anchois est effective à 13 °C jusqu'à 4 °C pendant 13 jours dans une marinade à 12 % de sel et 6 % d'acide acétique. Selon Arcangeli *et al.* (1996) et l'avis de l'Efsa (2010) un marinage de 13 jours avec 6 % d'acide acétique et 10 % de sel pendant 24 h à 4 °C est efficace pour éliminer les larves d'Anisakidae de la sardine. L'AESAN a conseillé pour l'anchois un marinage avec 6 % de sel et 2,4 % d'acide d'acétique pendant 35 jours (Augry, 2012). D'autres méthodes, conseillées par le MAPAQ (2011) sont utilisées pour le marinage des poissons : la marinade doit contenir au moins 4 % d'acide acétique, au moins 6 % de sel et le pH doit être inférieur à 4,2 (Augry, 2012 ; Efsa, 2010). Mais il n'existe pas de recommandation en Europe qui assure l'efficacité de la méthode de marinage. Selon l'Efsa (2010), aucune méthode n'est efficace. Ces différentes méthodes sont répertoriées dans le Tableau IX.

Tableau IX : Différentes conditions de marinage des produits de la pêche efficaces contre les Anisakidae.

Poisson	Conditions							Références
	Taux de sel (%)	Acide acétique	huile	peroxyde d'hydrogène	durée	température	pH	
Hareng (méthode allemande)	14	7	non	oui	5 semaines	3°C	-	Karl <i>et al.</i> , 1995
Hareng (méthode danoise)	10 pendant 17h à 12°C puis 5% acide acétique + 10% de sel à 3°C		non	non	17 h et plus	3°C	-	Karl <i>et al.</i> , 1995
Anchois	12%	10%	non	non	minimum 5 jours	4°C	-	Sanchez-Monsalvez <i>et al.</i> , 2005
Anchois	12%	6%	non	non	13 jours	4°C	-	Sanchez-Monsalvez <i>et al.</i> , 2005
Anchois	6%	2,4 %	non	non	35 jours	-	-	AESAN, 2007
Sardine	Acide acétique 6% + 10% de sel pendant 24 h puis adjonction d'huile et réfrigération à 4°C			non	plus de 24h	4°C	-	Arcangeli <i>et al.</i> , 1996
Type de poisson non indiqué	> 6%	> 4%	non	non	plus de 35 jours	-	< 4,2	MAPAQ, 2011

- Fumage

C'est un processus de traitement du poisson par l'exposition à la fumée de feu de bois ou de matières végétales. Le poisson peut subir une opération de fumage soit à chaud soit à froid afin d'obtenir un produit final au goût fumé. Lors du fumage à chaud, une combinaison de temps et de la température permet la coagulation complète des protéines du poisson frais. Selon l'avis de l'Afssa (2008) et de l'Efsa (2010), il faut atteindre une température comprise entre 70 °C et 80 °C pendant 3 à 8 heures pour tuer les parasites et les germes pathogènes pour l'Homme. Lors du fumage à froid, une combinaison entre le temps et la température permet la réduction de l'activité d'eau dans la chair de poisson (a_w) mais il n'y a pas d'effet significatif sur la coagulation des protéines. La température ne dépasse pas 40 °C (Afssa, 2008). Le poisson frais destiné au fumage à froid et les produits au goût de fumée (injection d'arôme) doivent subir une congélation en amont ou en aval du fumage pour assurer la mortalité des parasites notamment les nématodes (congélation à -20 °C en tout point du produit pendant 24 h, ou -35 °C pendant 15 h ou -20 °C pendant 7 jours). La procédure d'enlèvement des parasites doit être intégrée dans le processus de fumage.

IV.4.4. Autres méthodes alternatives de préservation des produits de la pêche

- Séchage

Le séchage permet de diminuer l'humidité présente dans les produits de la pêche dans des conditions de bonne pratique d'hygiène et ainsi de mieux conserver le produit. Le séchage naturel consiste à exposer le produit à l'air libre. Cette méthode n'est pas très connue mais elle est très utilisée dans les pays chauds (Asie, Afrique). Pour le séchage mécanique, la circulation d'air, la

température et le taux humidité sont contrôlés. A ce jour, aucune étude n'a montré l'efficacité du séchage pour l'élimination des larves d'Anisakidae (Efsa, 2010).

- Ionisation (irradiation)

L'ionisation consiste à exposer des aliments à des rayons ionisants. En France, l'ionisation des poissons et des coquillages est interdite. La dose permettant de tuer *A. simplex* est de 6-10 kGy. Mais cette dose ne permet pas de conserver les qualités organoleptiques des produits de la pêche. L'ionisation n'est pas considérée comme un traitement assainissant (Afssa, 2008 ; Efsa, 2010).

- Haute pression

L'application d'une pression de 300 MPa pendant 5 min a permis de tuer les larves d'*A. simplex* dans les maquereaux (*Scomber scombrus*) (Brutti *et al.*, 2010). L'inconvénient de cette méthode est le changement de couleur et de texture des produits de la pêche crus. Elle n'est pas très intéressante d'un point de vue commercial pour ces produits crus. En revanche, son application sur les produits de la pêche déjà transformés (fumés ou marinés), ne modifie pas les propriétés organoleptiques et son utilisation est en phase expérimentale (Efsa, 2010).

- Courant à basse tension

La méthode consiste à appliquer un courant électrique à basse tension dans un bassin d'électrolytes contenant des poissons. Cette méthode n'altère pas la qualité des produits de la pêche (Afssa, 2008 ; Efsa, 2010). A ce jour, son efficacité n'a pas encore été prouvée mais il est intéressant de développer cette méthode en raison de son utilité.

- Les condiments

Certains condiments ajoutés dans les plats peuvent agir sur la viabilité des Anisakidae telles que les feuilles d'une plante chinoise, la pérille de Nankin (*Perilla frutescens*) et le gingembre (*Zingiber officinale*). Ceci a été montré dans une étude conduite *in vitro* (Goto *et al.*, 1990). Une étude effectuée dans le modèle murin a montré que le citral monoterpène aldéhydique additionné de citronnelle alcoolique à la concentration de 46,9 mg pour 0,5 ml d'huile d'olive permettait de tuer 85,9 % et 67,5 % des larves L3 d'*A. simplex*. Cela a permis de diminuer les douleurs gastro-intestinales chez le rat (Hierro *et al.*, 2006).

La conservation des produits de la pêche sous atmosphère modifiée (mélange dioxyde de carbone et azote) ne permet pas non plus de détruire les antigènes ni d'inhiber la survie d'*A. simplex* (Pascual *et al.*, 2010). Ceci peut être expliqué par le fait qu'*A. simplex* et *Hysterothylacium* sont capables d'utiliser, voire nécessitent, le CO₂ (Dioxyde de Carbone) pour leur croissance, par exemple pour effectuer la mue du stade L3 à L4 *in vivo* (Iglesias *et al.*, 2005).

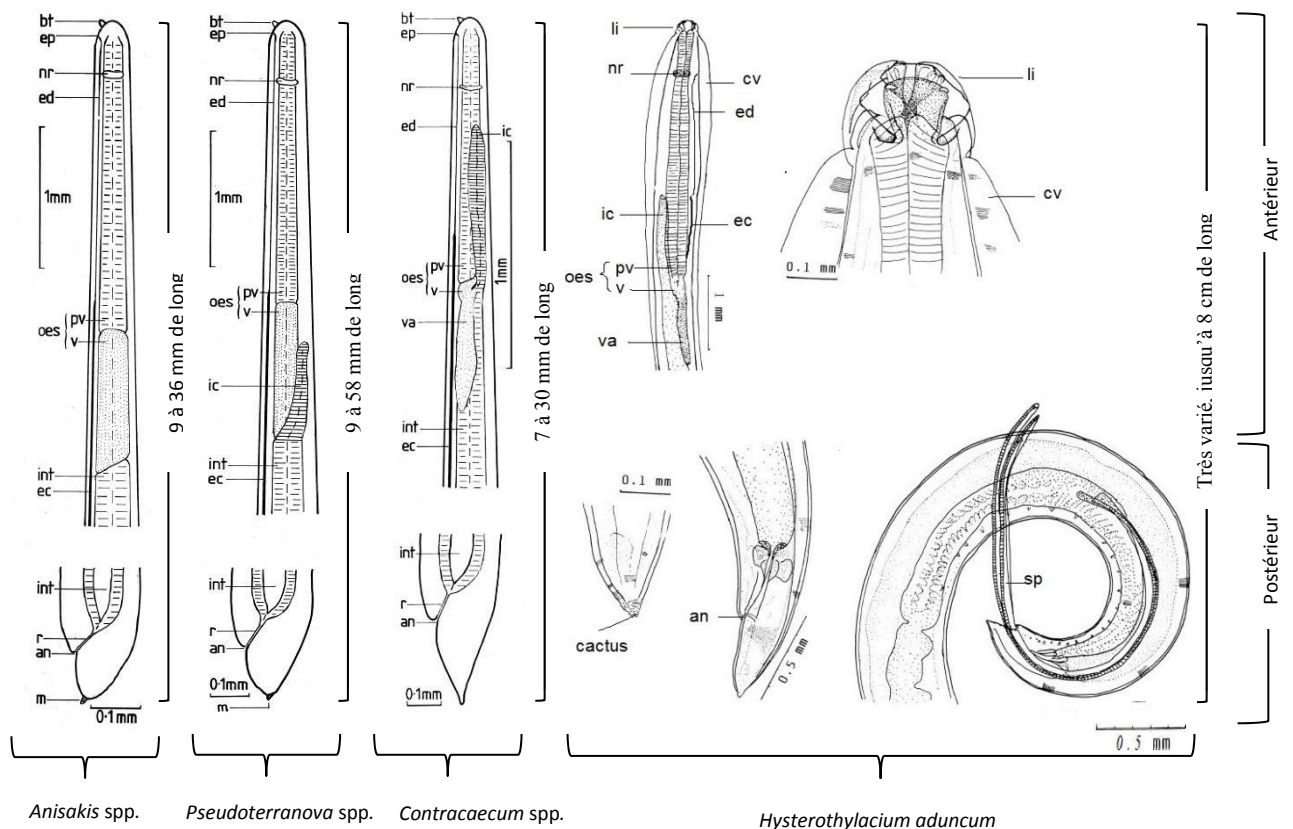
En revanche, ces méthodes de conservation des produits ne permettent pas de réduire le risque d'allergie aux Anisakidae.

V. Les méthodes d'identification des Anisakidae

Il existe plusieurs types de méthodes pour l'identification des Anisakidae. Chacune de ces méthodes possède ses limites pour répondre aux questions scientifiques.

V.1. Identification morphologique

Les caractères morphologiques des larves de stade L3 permettent l'identification des Anisakidae au niveau du genre. Ils ne permettent l'identification au niveau de l'espèce qu'en observant les individus adultes et particulièrement l'adulte mâle par l'examen des organes génitaux et des structures spécifiques des formes adultes (spicules copulateurs, valvule, etc.). Cette méthode a permis de classer les Anisakidae en différents genres mais elle est insuffisante pour distinguer les espèces (Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Smith et Wootten, 1978). L'identification se fait à l'aide d'un microscope. Les parasites isolés des différents organes sont nettoyés sous la loupe binoculaire dans de l'eau physiologique et sont soit identifiés immédiatement soit conservés dans de l'éthanol 70° additionné de glycérol à 5 % ou dans un autre milieu de conservation pour une identification ultérieure. Le lactophénol peut être utilisé pour transpariser le parasite (Huang, 1988 ; Klimpel *et al.*, 2004). Certains auteurs ont également recours à la microscopie électronique à balayage pour observer les organes extérieurs discriminant (Abollo et Pascual, 2002). L'identification morphologique des larves de stade L3 chez *Anisakis*, *Contracaecum* et *Pseudoterranova* et des stades L3 et L4 chez *Hysterothylacium* repose sur des caractères discriminants repris dans la Figure 17 (Berland, 1991 ; Berland, 1961 ; Huang, 1988 ; Huang, 1988 ; Möller, 1989 ; Smith, 1984 ; Smith et Wootten, 1984a ; Smith et Wootten, 1984b). Les organes que ces 4 genres possèdent en commun sont un pore excréteur, un système nerveux en forme de collier péri-oesophagien, un conduit et un canal excréteurs, un tube digestif comprenant un œsophage scindé en deux parties, le proventricule et le ventricule, un rectum et un anus.



Les différentes abréviations signifient : bt : dent foreuse antérieure (boring tooth), ep : pore excréteur (excretory pore), nr : collier nerveux péri-oesophagien (nerve ring), ed : conduit excréteur (excretory duct), li : lèvres (lips), cv : crêtes latérales (winglike cervical alae) oes : oesophage (oesophagus) qui comprend pv : proventricule (pre-ventriculus) et v : ventricule (ventriculus), ic : caecum intestinal (intestinal caecum), int : intestin (intestine), va : appendice ventriculaire (ventricular appendix), ec : canal excréteur (excretory canal), sp : spicules copulateurs mâles (appareil génital mâle), r : rectum, an : anus, m : mucron, cactus : queue en forme de cactus.

Figure 17 : Caractères morphologiques discriminants des larves L3 d'Anisakidae.

A. simplex (Smith et Wooten, 1984a), *P. decipiens* L3 (Smith et Wooten, 1984b), *Contraecaecum* spp. L3 (Smith, 1984) et *Hysterothylacium aduncum* L3 et adultes (Berland, 1991) .

V.1.1. Larve de stade L3 appartenant au genre *Anisakis* spp.

Selon Smith and Wooten (1984a), les larves de stade L3 appartenant au genre *Anisakis* sont caractérisées par la présence d'une dent foreuse (Figure 17), l'oesophage, puis l'intestin, le rectum et l'anus. L'extrémité caudale comporte ou non un mucron (voir ci-dessous). La longueur d'une larve est comprise entre 9 et 36 mm. Il est possible de distinguer les larves L3 appartenant au genre *Anisakis* de type I ou II selon les caractères énumérés ci-dessous :

- *Anisakis* de type I : ventricule long, pas de caecum intestinal ni d'appendice ventriculaire, limite entre ventricule et intestin oblique, extrémité caudale arrondie pourvue d'un mucron (Figure 17).
- *Anisakis* de type II : ventricule court, pas de caecum intestinal ni d'appendice ventriculaire, limite entre ventricule et intestin droite, extrémité caudale conique dépourvue de mucron.

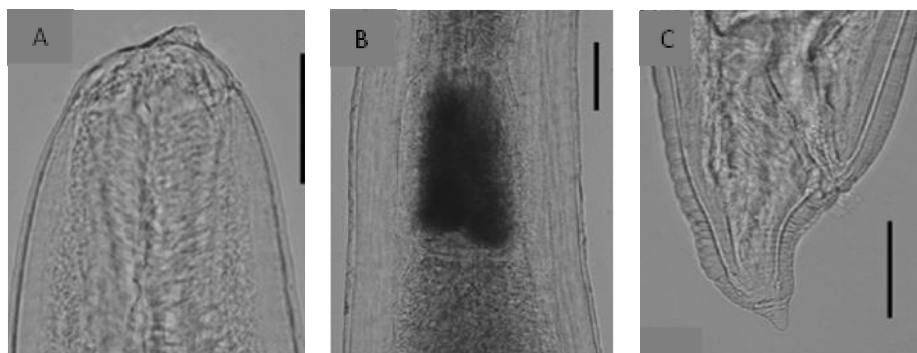


Figure 18 : Photos d'*Anisakis* spp. L3 prise en au microscope optique (Murata *et al.*, 2011). (A) Extrémité antérieure montrant la dent foreuse ; (barre d'échelle = 500 μ m) ; (B) ventricule sombre (barre d'échelle = 100 μ m) ; (C) Extrémité caudale avec l'anus et le mucron (barre d'échelle = 100 μ m).

V.1.2. Larve de stade L3 appartenant au genre *Pseudoterranova* spp.

Sa morphologie ressemble à celle d'*Anisakis* (Figure 17). Une dent foreuse est présente à l'extrémité antérieure, le ventricule est court et un cæcum intestinal rétrograde est présent (Figure 17 et Figure 19A). La taille du caecum intestinal est égale à ou représente la moitié de celle du ventricule. Le mucron est présent à l'extrémité postérieure (Figure 19B). La longueur d'une larve est comprise entre 9 et 58 mm (Smith et Wootten, 1984b).

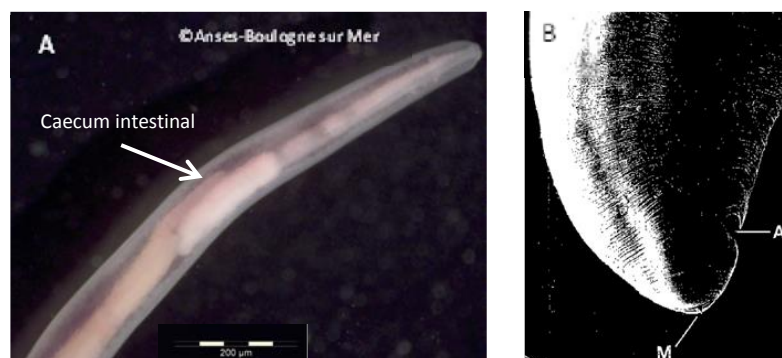


Figure 19 : Photos d'une larve de *Pseudoterranova* spp. de stade L3 (A) : partie antérieure contenant le caecum intestinal qui remonte à côté du ventricule et le ventricule de couleur blanchâtre (barre d'échelle = 200 μ m, prise au microscope optique). (B) : partie postérieure (prise au microscopie à balayage, (Chai *et al.*, 1995)

V.1.3. Larve de stade L3 appartenant au genre *Contracaecum* spp.

Selon la Figure 17, la larve du parasite présente une dent foreuse à l'extrémité antérieure (Figure 17et Figure 20) et un ventricule assez long. Le cæcum intestinal et l'appendice ventriculaire sont presque de la même longueur que le ventricule. L'extrémité caudale est conique et dépourvue de mucron (Figure 20A et B). La longueur d'une larve est comprise entre 7 et 30 mm (Smith et Wootten, 1984b).

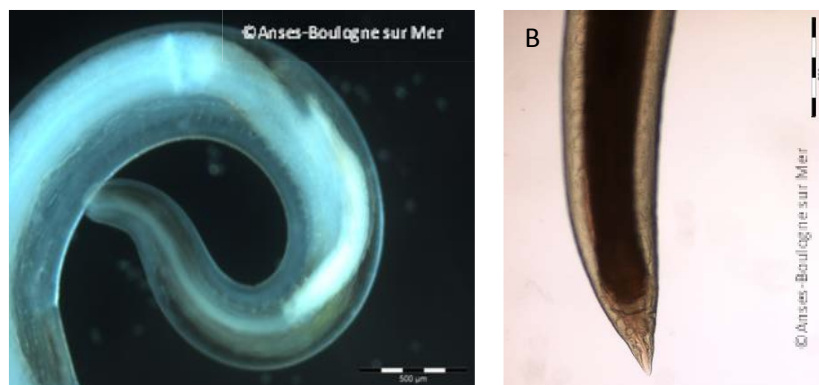


Figure 20 : Larve de stade L3 du genre *Contracaecum* spp. prise au microscope optique: (A) extrémité antérieure avec la masse blanche représentant le caecum intestinal (barre d'échelle = 500 µm) ; (B) extrémité postérieure.

V.1.4. Larve de stade L3 appartenant au genre *Hysterothylacium* spp.

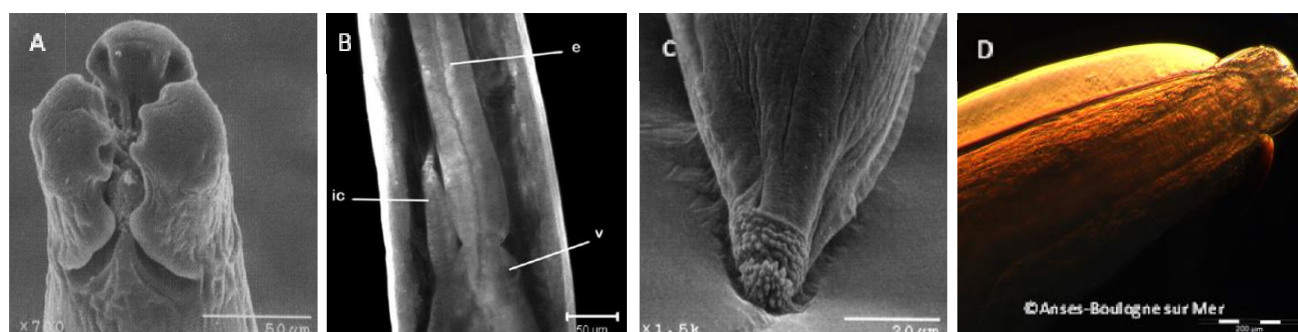


Figure 21 : Photo d'*Hysterothylacium* spp. au stade adulte prise au microscope électronique à balayage. (A) Extrémité antérieure montrant les 3 lèvres buccales (Gopar-Merino *et al.*, 2005)(barre d'échelle = 50 µm) ; (B) Région médiane du ver, à gauche du parasite, le caecum intestinal qui remonte vers le haut de l'animal, l'œsophage contenant le préventricule et le ventricule au milieu entre le caecum intestinal et l'appendice ventriculaire (barre d'échelle = 50 µm) (e : œsophage, ic : caecum intestinal, V : ventricule) ; (c) : Extrémité caudale en cactus, (Gopar-Merino *et al.*, 2005), (barre d'échelle = 20 µm) ; (D) : microscopie optique crêtes latérales sur le côté du parasite, (barre d'échelle = 200 µm).

Dans la Figure 17, selon Berland (1991), la bouche est entourée de trois lèvres proéminentes (Figure 21A). La larve possède également un pore excréteur qui se situe à la hauteur du collier nerveux péri-oesophagien, des crêtes latérales sur le côté du corps (Figure 21D), un caecum intestinal et un appendice ventriculaire de la même longueur que le ventricule (Figure 21 B), l'extrémité caudale en cactus des adultes mâle et femelle est clairement visible (Figure 21C). C'est le seul genre qu'on retrouve au stade adulte chez les poissons, il faut noter la présence de spicules copulateurs chez le ver adulte mâle. La longueur peut atteindre 8 cm pour les femelles.

V.2. Identification par les méthodes biochimiques

V.2.1. MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis)

Cette méthode est aussi parfois appelée MLEE ou typage isoenzymatique. Elle était très utilisée pour l'identification de nouvelles espèces ou pour la vérification de la taxonomie des organismes. Elle

peut être appliquée dans la domaine de la bactériologie (Selander *et al.*, 1986), de la botanique (Mitton *et al.*, 1979) aussi bien que de la parasitologie (Mattiucci et Nascetti, 2008). Le pouvoir discriminant de cette méthodologie est basé sur la mobilité relative d'enzymes intracellulaires extraites des organismes à identifier. Sur un gel d'électrophorèse horizontal en conditions non dénaturantes, les enzymes sont séparées selon leur charge électrique, leur poids moléculaire et leur conformation. La charge électrique et donc la mobilité des protéines sont différentes selon les acides aminés qui les composent. Certaines enzymes sont polymorphes et des mutations dans la partie codante des gènes correspondant peuvent induire des substitutions d'acides aminés ce qui modifiera la charge nette de la protéine et ainsi sa mobilité électrophorétique. Ces différentes formes de protéines distinguées par sa mobilité sont appelées électromorphes ou isoenzymes. Depuis le milieu des années 1980, des clés d'identification des Anisakidae basées sur des méthodes MEE sont disponibles. De nouvelles espèces ont ainsi été décrites et leurs positions taxonomiques ont pu être comparées. Parfois, la méthode MEE a été menée en parallèle de la méthode d'identification morphologique ou d'outils de biologie moléculaire (Mattiucci *et al.*, 1986 ; Mattiucci *et al.*, 1998 ; Mattiucci *et al.*, 2001 ; Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Valentini *et al.*, 2006). La MEE est une méthode d'identification qui impose le traitement individuel de chaque échantillon et elle ne peut être réalisée qu'à partir d'échantillons frais ou congelés (Mattiucci et Nascetti, 2008) mais elle a permis d'étudier la phylogénie des Anisakidae à la lumière du concept de l'évolution linéaire (Adams, 1998).

V.2.2. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

L'utilisation de l'immunologie pour identifier la présence d'anticorps dans les produits de la pêche ou chez le patient est également utilisée. Cette méthode est rapide mais sans l'antigène parasitaire cible, elle n'est pas réalisable (Xu *et al.*, 2010).

V.3. Identification par les méthodes moléculaires

V.3.1. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique d'amplification *in vitro* qui permet de copier un grand nombre de fois une séquence cible d'ADN (Acide désoxyribonucléique) à partir d'une faible quantité d'acide nucléique (Zhu *et al.*, 1998). Cette méthode a permis l'identification d'Anisakidae congelés ou conservés dans l'alcool ou le formol (Mattiucci et Nascetti, 2008). Plusieurs gènes ont été utilisés (Mattiucci *et al.*, 2003) en PCR en point final comme le gène mitochondrial codant pour le cytochrome b (mtDNA *cytb*) (Mattiucci *et al.*, 2003), le gène codant pour la cytochrome oxydase mitochondriale 2 (*COX2*) (Valentini *et al.*, 2006), le gène codant pour la cytochrome oxydase mitochondriale 1 (*COX1*) (Blouin, 2002), l'ARN ribosomal de la petite sous-unité (ssrRNA), l'ARN ribosomal de la grande sous-unité (lrrRNA) (Hu *et al.*, 2001), l'espaceur transcrit

interne 1 de l'ADNr (ITS1, Internal transcribed spacer 1) et l'espaceur transcrit interne 2 (ITS2, Internal transcribed spacer 2) de l'ADNr et enfin d'autres séquences d'ADN ribosomal (Chen *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2008 ; Nadler *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*, 1998). La PCR en point final peut être couplée à d'autres techniques et se décline ainsi en différentes variantes qui permettent d'identifier des Anisakidae.

La PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*) : un produit amplifié obtenu par PCR en point final est digéré à l'aide d'enzymes endonucléases (encore appelées enzymes de restriction) qui coupent la séquence nucléotidique à un endroit spécifique appelé site de restriction. Les séquences nucléotidiques étant variables d'une espèce à l'autre, certaines enzymes de restriction seront actives sur les séquences cibles de certaines espèces mais pas sur d'autres. Les profils de digestion enzymatique sont déposés sur gel et comparés après migration électrophorétique. Les espèces d'*Anisakis* ont ainsi été identifiées selon leurs profils de restriction (D'Amelio *et al.*, 2000 ; Cavallero *et al.*, 2011 ; Espiñeira *et al.*, 2010 ; Szostakowska *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 2007).

PCR-SSCP (*PCR-single strand conformational polymorphism*) (Figure 22): Elle consiste à étudier le polymorphisme en analysant la variation des allèles sur le gène d'ADN simple brin. Le principe repose sur la mobilité électrophorétique d'une molécule d'ADN simple brin sur un gel non-dénaturé de polyacrylamide. Un produit PCR est dénaturé et un agent intercalant est fixé sur l'ADN simple brin de façon irréversible. L'ADN simple brin change alors de conformation pour prendre une structure secondaire ou tertiaire. Ceci permet de différencier deux produits de PCR après la migration électrophorétique sur un gel non-dénaturé. Cependant, des études récentes ont démontré que la SSCP ne permet de visualiser des différences de nucléotides simples que pour des amplicons de 300 à 530 pb (examinées par Gasser et Zhu, 1999, (Gasser et Monti, 1997 ; Zhu *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 2007). Ainsi, les molécules de différentes conformations (par exemple, en raison d'un changement d'un seul nucléotide) peuvent être séparées dans des gels de polyacrylamide non dénaturant en raison de leurs différences de mobilité. La méthode a cependant également été utilisée pour visualiser des mutations ponctuelles pour des petits amplicons (100-300 pb) (Cotton, 1997).

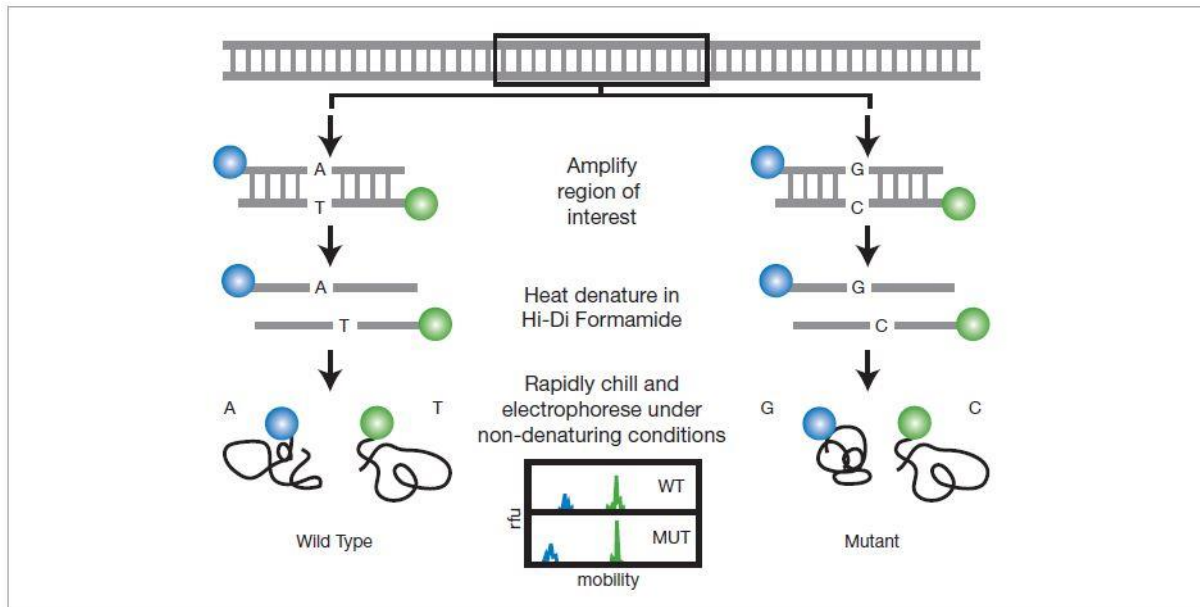


Figure 22 : Principe de la PCR-SSCP

A partir du produit PCR d'un gène cible, l'ADN est dénaturé. L'agent intercalant se fixe sur l'ADN simple brin. Celui-ci prend une forme soit secondaire soit tertiaire. La migration des produits est faite sur le gel de polyacrylamide non-dénaturé. La méthode d'électrophorèse a permis d'effectuer la migration des produits et l'identification repose sur leur distance de migration différente (Life Technologies Corporation, 2010).

PCR-multiplex : permet l'identification individuelle d'Anisakidae en utilisant plusieurs couples d'amorces spécifiques pour la détection de plusieurs fragments d'ADN de plusieurs espèces d'Anisakidae sur une même réaction PCR (Fang *et al.*, 2010 ; Umehara *et al.*, 2008).

V.3.2. La PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel (rtPCR)

Une réaction de polymérisation en chaîne où un marqueur de fluorescence est intégré dans chaque copie d'ADN amplifié permet la quantification précise en temps réel du nombre de copies synthétisées à chaque cycle de PCR. En 2010, cette méthode brevetée en 2009 (numéro de brevet : WO 2009095729 A1) a permis la détection d'*Anisakis* spp. et de *Pseudoterranova* spp. dans les produits de la pêche et des produits dérivés en utilisant la technologie TaqMan sur l'ITS-1 et le gène de l'ARNr 18S (ARN ribosomique 18S) (Mossali *et al.*, 2010). L'amplification d'ITS-2 a été utilisée pour identifier *A. pegreffii* avec la technologie TaqMan également (Fang *et al.*, 2011). Une étude a démontré que la PCR quantitative permettait de détecter la présence d'une larve d'*Anisakis* dans 25 g de différents produits de la pêche transformés et, ceci en utilisant le gène *COX2* avec une sonde TaqMan (Lopez et Pardo, 2010). Vingt-cinq grammes de produits de la pêche permettent d'obtenir 40 ppm de protéines allergènes présentes. C'est le seuil de protéine allergène présent acceptable déterminé selon Poms *et al.*, 2004. Une PCR en temps réel qui cible le gène *COX2* et qui utilise le Sybergreen, un intercalant de l'ADN fluorescent associé au LightCycler® (Roche) a été développée dans le présent travail (voire III.10 Expériences en qPCR pour la transformation du résultat du HTS en

nombre d'Anisakidae relatif). Une autre étude a utilisé le post-*qPCR* (High Resolution Melting) pour confirmer le profil d'une espèce hybride issue du croisement d'*A. simplex* avec *A. pegreffii* (Cavallero *et al.*, 2014).

V.4. Métagénomique et utilisation du séquençage à haut-débit

A ce jour, le nombre d'études métagénomiques (*meta* provient du grec et signifie « ce qui vient après », *génomique* signifie « l'ensemble des gènes d'un individu ») utilisant le séquençage (*whole genome shotgun* de microorganismes constitutifs d'un échantillon) a augmenté ces dernières années de façon exponentielle. Malgré tout, ces approches constituent toujours un défi pour ce qui concerne la partie analytique. Ce type d'approches ne peut être applicable à un grand nombre d'échantillons. A contrario, les approches métagénomiques ciblant, les gènes de l'ARNr 16S ou 18S (ARN ribosomique 16S) ou des fragments de ces gènes sont très souvent utilisées pour comparer la position taxonomique des organismes vivants et les identifier. L'ADN ribosomal pour l'identification des Anisakidae a été ciblé dans certaines études, notamment pour l'accomplissement d'analyses phylogénétiques, de coévolution et d'écologie (Garbin *et al.*, 2011 ; Koinari *et al.*, 2013 ; Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Mattiucci *et al.*, 2011).

Le terme de métagénomique (qui est relatif au gène) serait plus approprié (Esposito et Kirschberg, 2014) et sera utilisé ici puisque, dans ce travail, nous avons comparé la séquence d'un fragment du gène *COX2* pour identifier les Anisakidae. La métagénomique en utilisant l'approche de *HTS* (*High Throughput Sequencing* ou séquençage à haut-débit) permet de déduire l'abondance relative des éléments constitutifs d'un échantillon biologique en séquençant profondément des produits *PCR* dont la matrice est un *locus* informatif. Par informatif est entendu un locus dont les séquences nucléotidiques sont abondantes dans les bases de données de séquences, pour lequel une ou plusieurs régions variables permettent de discriminer des taxons entre eux, tout en possédant au moins deux séquences relativement conservées flanquant les régions variables, permettant d'être utiles à des fins d'amorçage des oligonucléotides utilisés lors de la *PCR*. Satisfaisant les critères précédents, le gène *COX2* a été choisi pour l'identification des Anisakidae ce dernier ayant été largement ciblé dans un grand nombre d'études par le passé (Mattiucci *et al.*, 2008 ; Mattiucci, Paoletti, et S.C. Webb, 2009 ; Valentini *et al.*, 2006).

L'étude de métagénomique qui consiste à identifier des Anisakidae par *HTS* menée durant ce travail de thèse est une approche relativement innovante puisque à l'exception de quelques études ciblant l'ARNr 18S pour l'identifier des nématodes du sol par *HTS* (Darby *et al.*, 2013 ; Porazinska *et al.*, 2009), aucune autre étude métagénomique n'a été effectuée sur les Anisakidae et en utilisant le locus *COX2* comme base de discrimination en *HTS*. Le séquençage *Sanger*, quant à lui, ne peut être

utilisé que pour identifier des nématodes individualisés. Dans le cadre de ce travail, un grand nombre de nématode a été découvert. Le *HTS* constituait donc une technique mieux adapté au grand nombre de nématodes à traiter.

Trois générations de technologies de séquençage multiparallélisé (ou à haut-débit) d'ADN existent à ce jour : le séquençage *Sanger*, le séquençage à haut-débit de 2^{ème} génération (les technologies avec amplifications clonales : ILLUMINA, ROCHE, ION TORRENT) et de 3^{ème} génération (sans amplification clonale ou molécule unique (PACBIO, OXFORD NANOPORE). La première génération de séquençage à haut-débit a été mise sur le marché peu avant la deuxième mais elle a très rapidement été abandonnée (LYNX).

Les séquenceurs de paillasse de deuxième génération (PGM™ Ion Torrent, MiSeq, GS junior), commercialisés en 2011, ont permis de séquencer à moindre coût, et de rendre la technologie de séquençage accessible à de plus petits laboratoires. Ce séquençage comporte trois étapes clés : réalisation de la librairie, amplification clonale et séquençage haut-débit comme illustré dans la Figure 23. Cette figure permet d'avoir un aperçu des étapes clés des techniques du séquençage *Sanger* et des séquençages de 2^{ème} et 3^{ème} générations telles que la préparation de la matrice de séquençage (*template*), la méthode de séquençage, l'imagerie et le traitement des résultats (Metzker, 2010).

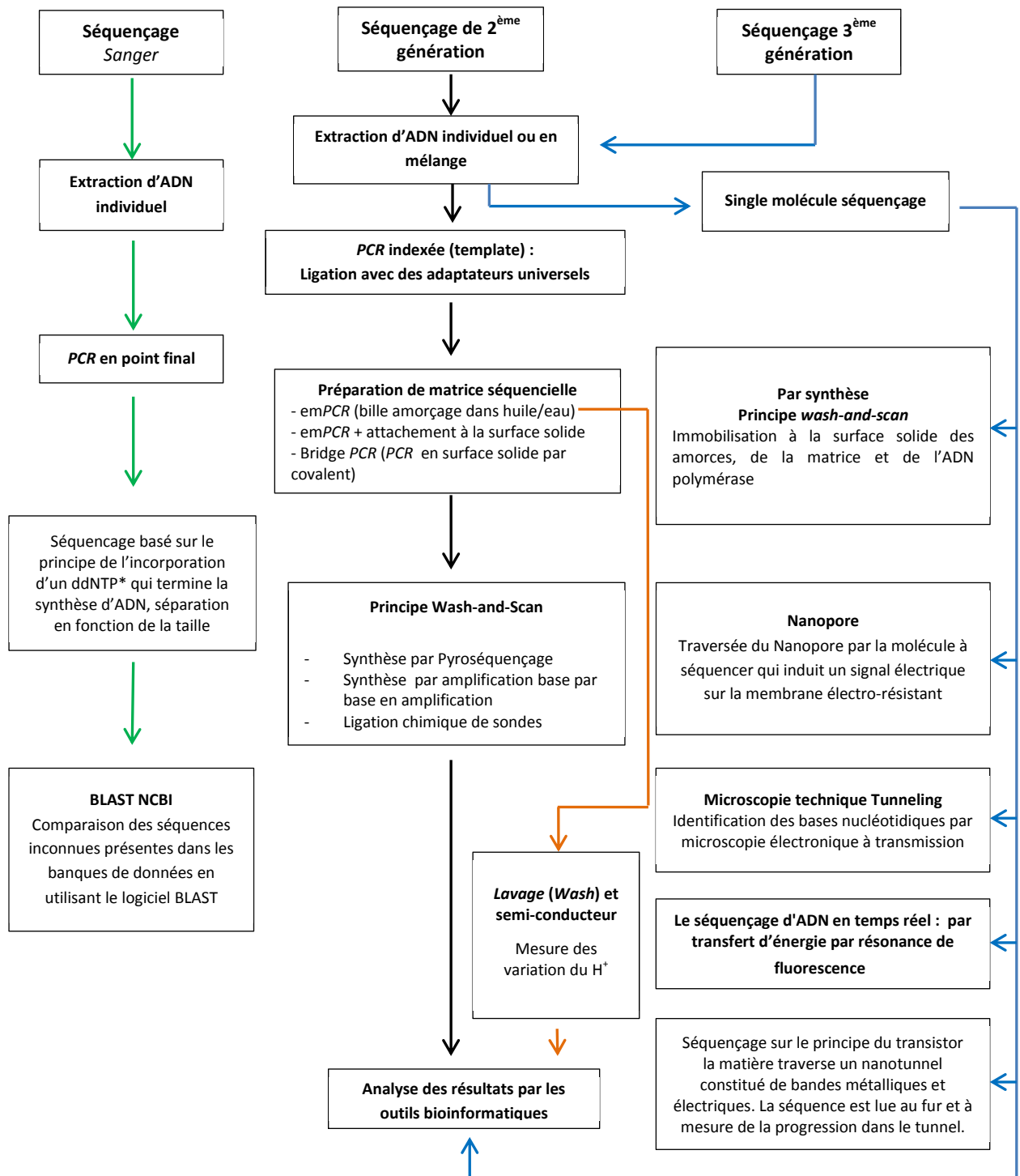


Figure 23 : Schéma récapitulatif des étapes clés des différentes technologies de séquençage (Sanger, séquençage à haut-débit de 2^{ème} et 3^{ème} génération).

A gauche sont représentées les étapes importantes du séquençage Sanger (flèches vertes) ; au centre, le séquençage de 2^{ème} génération (flèches noires) ; et à droite, la 3^{ème} génération (flèches bleues). Une méthode de séquençage de 2^{ème} génération dont le principe de séquençage est différent de celui des autres techniques est également figurée (flèches orange, PGM™ Ion Torrent). * ddNTP : Didésoxyribonucléotide triphosphate marqué.

V.4.1. Les étapes clés du séquençage haut-débit de 2^{ème} génération pour son application en métagénomique

Pour ce qui concerne le séquençage d'amplicon deux variantes sont possibles :

- une première souvent dénommée « Amplicon-Seq » où dans un premier temps une *PCR* est réalisée, puis une ligation d'adapteurs universels de séquençage pour obtenir la librairie à séquencer
- la seconde méthode, choisie dans notre étude, dénommée fusion-*PCR*, utilise des amorces de *PCR* porteuses en leur partie 5' d'adapteurs universels de séquençage

La préparation des librairies : la librairie est obtenue après une *PCR* en point final. Les amorces employées seront constituées en leur partie 3' de la portion s'amorçant sur le locus *COX2*, dans leur partie 5' des séquences nécessaires au procédé de séquençage : les adaptateurs universels ainsi qu'une séquence oligonucléotidique permettant d'identifier par un code-barre la librairie réalisée. Cette approche permettra en utilisant une séquence floquée d'un code-barre singulier pour chaque échantillon, de multiplexer la phase de séquençage. Cette approche appelée indexation (Figure 23), est commune à toutes les plateformes de séquençage de 2^{ème} génération.

L'amplification clonale de la matrice de séquençage permet de multiplier la quantité de molécules disponibles comme matrice de séquençage. Cette étape est réalisée sur un support : une surface en plaque solide ou bille; elle est généralement réalisée par *PCR* (bridge-*PCR* pour la technologie Illumina, *PCR* en émulsion pour les technologies Roche et Ion Torrent), où des amorces ciblent les adaptateurs universels bornant les fragments de la librairie.

Les technologies de séquençage de 2^{ème} génération se basent sur le principe du *wash-and-scan*. A l'exception des méthodes de séquençage par ligation (telle que celle du SOLID, Applied Biosystems), le principe est appliqué à la polymérisation des nucléotides séquentiellement injectés et « lavés ». Dès que la première étape de polymérisation est réalisée, une étape de lavage permet d'éliminer l'excès de nucléotides (Schadt *et al.*, 2010). Etape après étape d'injection, polymérisation, lavage, le signal brut constitué d'images dans le cas de technologies faisant appel à des nucléotides modifiés (Illumina, Roche) ou constitué de variation de pH dans le cas de technologie usant de nucléotides natifs (Ion Torrent). Selon le type de signal émis lors de la synthèse d'ADN, les technologies peuvent être distinguées comme ce qui suit:

- **le pyroséquençage** : un signal luminescent est libéré suite à la polymérisation du nucléotide ou des nucléotides appropriés. Cette polymérisation libère un pyrophosphate, celui-ci est transformé en ATP (Adénosine-5'-triphosphate) par une sulfurylase. L'ATP est utilisée par la luciférase pour oxyder la luciférine engendrant un signal luminescent. Le signal luminescent est plus ou moins intense selon

la quantité de nucléotides incorporés. Les plateformes de séquençage basées sur ce principe sont les technologies Roche : GS Junior Titanium et GS FLX+System.

- **le séquençage par la détection d'ion H⁺** (Ion PGM et Ion Proton, Life Technologies), c'est la technologie utilisée durant cette étude. Le principe repose sur la polymérisation d'un nucléotide natif qui entraîne la libération d'un ion H⁺, ce qui a pour effet de faire varier le pH du puits dans lequel la séquence matricielle est enfermée. Cette variation de pH est détectée grâce à un système de semi-conducteurs situés en-dessous de la puce de séquençage qui traduit le signal des ionogrammes en séquences (Figure 24) (Whiteley *et al.*, 2012). L'utilisation de nucléotides natifs permet une réduction des coûts (Schadt *et al.*, 2010).

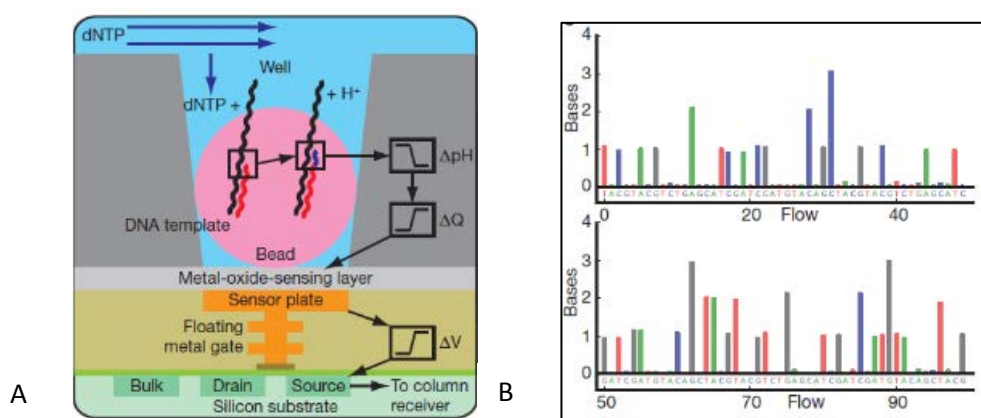


Figure 24 : Schéma illustrant le principe de séquençage de paillasse PGM™ Ion Torrent utilisé dans l'étude. (A) : le principe de séquençage, (B) : signal et principe de la traduction (ou basecalling) des résultats des ionogrammes en séquences (Rothberg *et al.*, 2011).

- **le séquençage par ligation chimique** de sondes fluorescentes: le principe est basé sur l'utilisation de sondes formées de deux bases nucléotidiques (sondes di-bases) étiquetées par un fluorochrome. La synthèse d'ADN est suivie grâce à des émissions de fluorescence ou de luminescence et la synthèse continue (Metzker, 2010). Les plateformes utilisant ce principe sont : SOLiD 5500 xl et SOLiD 5500 (Applied Biosystems - Life technologies). Ces plateformes, bien qu'engendrant des données d'excellente qualité (Q50), restent confinées dans de rares laboratoires du fait de son coût d'utilisation relativement peu compétitif et de la faible taille des reads générés (35 bases).

Malgré les grandes capacités de séquençage atteintes par ces technologies de deuxième génération, quelques points critiques sont à prendre en considération :

Il existe un facteur multiplicatif de 10 entre l'investissement d'un séquenceur de paillasse PGM (Ion Torrent) et un HiSeq2500 (Illumina) l'un des séquenceurs les plus puissants sur le marché actuellement.

La Figure 25 et la Figure 26 permettent de comparer les différentes technologies de séquençage de 2^{ème} génération.

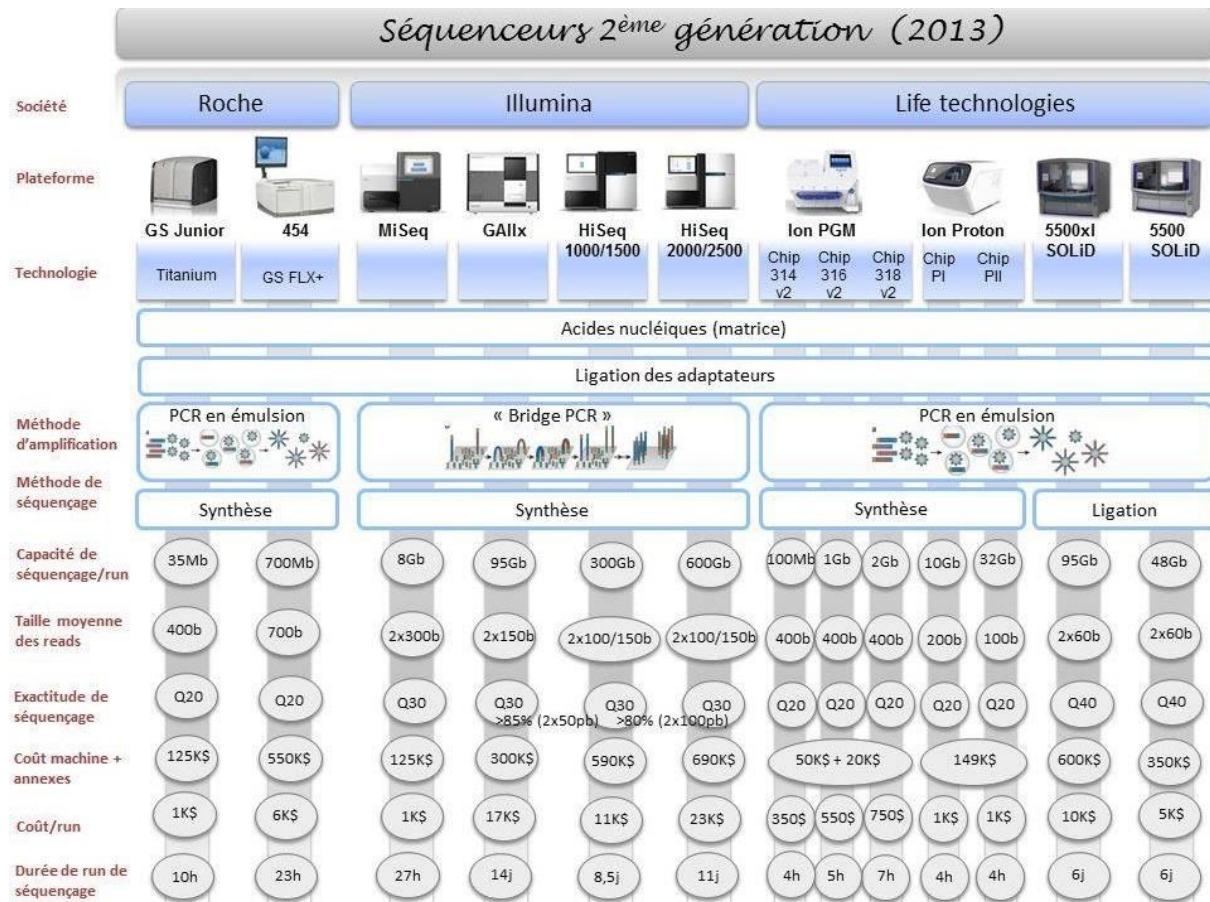


Figure 25 : Propriétés de différents séquenceurs de 2^{ème} génération (<http://www.biorigami.com/?m=201111>, consulté le 05/04/2015)

La Figure 25 propose une comparaison des diverses plateformes de séquençage proposées par les trois principaux acteurs du marché du séquençage haut-débit de 2^{ème} génération. La diversité des solutions couvrent le très large spectre des applications de génomique et transcriptomique haut-débit. Dans le cadre de ce sujet visant à identifier et caractériser l'abondance relative des Anisakidae, l'étude s'apparente totalement aux études métagénomiques 16S visant à caractériser l'abondance relative des bactéries constitutives d'un échantillon biologique. Les prérequis technologiques sont proches voire identique. Le séquençage sur la plateforme PGM™ Ion Torrent en utilisant la puce 318 Chip V2 a permis d'obtenir au maximum 2 GB de séquences avec une taille moyenne de 400 pb et un taux d'erreur d'une base pour 100 pb en 4 h de séquençage, ceci paraît suffisant pour pouvoir identifier les Anisakidae. Il existe des plateformes plus performantes mais le coût et le temps sont relativement plus importants, par exemple SOLiD 5500 xl et SOLiD 5500 avec une capacité de séquençage débutant à 48 Gb et une qualité de Q40 (une erreur toutes les 10000 bases) ou le séquençage sur la famille de plateforme illumina : Miseq, GAIIx, HiSeq 1000/1500, HiSeq 2000/2500.

Par rapport à PGM™ Ion Torrent, l'amplification clonale est faite en Bridge-PCR, il n'y a pas de dimères d'amorces, mais le coût est forcément plus élevé et le temps de séquençage plus long.

Séquenceurs 2 ^{ème} génération (2013)													
Société	Roche		Illumina				Life technologies						
Plateforme													
Technologie	Titanium	GS FLX+			1000/1500	2000/2500	Chip 314 v2	Chip 316 v2	Chip 318 v2	Chip PI	Chip PII	SOLiD	SOLiD
Génome humain	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓
Exome	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓
Petit génome (Bactéries, levures)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Régions ciblées	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Transcriptome	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓
Chip-Seq	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
Métagénomique	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Figure 26 : Champs d'application des différents séquenceurs de 2^{ème} génération (<http://www.biorigami.com/?m=201111> , consulté le 05/04/2015)

Comme indiqué précédemment, chaque séquenceur possède une certaine capacité en termes de séquences lues avec différents niveaux de qualité. En fonction de la taille des génomes à séquencer et de l'exactitude recherchée, certains séquenceurs seront mieux adaptés à l'application désirée que d'autres. Le séquençage de petits génomes (bactéries et levures) ainsi que le séquençage de régions génomiques ciblées peuvent être réalisés sur toutes les plateformes (Figure 26). Même si le PGM™ Ion Torrent comme la technologie Roche ne permettent pas de toucher le maximum du spectre des applications, il s'agit des deux plateformes les plus adaptées à la problématique de l'étude d'Anisakidae. Le manque de sensibilité de la plateforme PGM™ Ion Torrent par rapport aux autres dispositifs n'est pas problématique car cet inconvénient apparent est jugulé par l'étape de PCR indexée.

Aujourd'hui, les technologies métagénomiques sont couramment utilisées. Cette évolution a été rendue possible grâce au séquençage Sanger et aux techniques de séquençage de 2^{ème} génération (Schadt *et al.*, 2010). La méthode Sanger est aujourd'hui moins puissante mais elle reste fiable et parfois elle sert à valider les résultats issus du NGS. Elle est simple car il n'y a pas besoin de

traitement bioinformatique puisqu'elle ne permet de traiter qu'un faible nombre de séquences. La longueur moyenne des séquences obtenues par séquençage *Sanger* est considérable par rapport aux technologies de séquençage de 2^{ème} et 3^{ème} générations. En revanche, le coût du séquençage par base reste très élevé. Face aux grands nombres d'échantillons à séquencer pour certains projets scientifiques, elle est fastidieuse voire irréalisable (Harismendy *et al.*, 2009 ; Quail *et al.*, 2012 ; Schadt *et al.*, 2010) comme cela a été expérimenté au cours du programme *Fish-Parasites*. Les techniques de séquençage de 2^{ème} génération se basent sur le principe d'une succession de lavages ce qui allonge le temps de l'expérience et la rend complexe. De plus, la taille moyenne des séquences est plus petite que celle des séquences lues après un séquençage *Sanger*. Il existe plusieurs plateformes de séquençage de 2^{ème} génération (Figure 25 et Figure 26). La quantité de séquences produites est considérable, la qualité est élevée pour certaines plateformes et le coût d'analyse par base diminue par rapport à un séquençage *Sanger* équivalent. Ensuite, pour traiter toutes ces données, il faut mettre en place un traitement complexe de bioinformatique. La troisième génération de séquençage possède les avantages de lire les séquences inconnues sur des longueurs importantes et de proposer un coût moindre puisque la lecture de la séquence est électronique et non pas optique. L'analyse des données produites par ces technologies de séquençage de 3^{ème} génération doit être effectuée en haut voire en très haut-débit. Le temps de lecture des séquences est plus court. Le prix de revient par séquence diminue également puisque la matrice est une molécule d'ADN unique et que donc l'étape de *PCR* n'est plus nécessaire. Mais, à ce jour, il n'y a que peu de plateformes fonctionnelles qui sont disponibles sur le marché et surtout leurs exactitudes restent modérées. Il faut également développer de nouvelles méthodes de traitement des données des séquences produites (Schadt *et al.*, 2010).

V.4.2. L'analyse bioinformatique des données de séquençage à haut débit.

Face à ces progrès des technologies de séquençage de deuxième génération (voire de 3^{ème} génération à venir), les quantités de séquences et donc de données produites peuvent être très vite conséquentes (de quelques dizaines de milliers à plusieurs centaines de millions par run selon les plateformes de séquençage). L'exploitation de ces grands volumes de données constitue un défi bioinformatique et peut être une limite pour le biologiste. L'interdisciplinarité est donc nécessaire afin que l'expertise bioinformatique puisse répondre aux cahiers des charges du biologiste qui sera amené, bien souvent, à effectuer les bioanalyses. Le rôle de l'expertise bioinformatique consiste, dans ce cas précis, au développement de pipelines qui peuvent être définis comme une succession d'étapes informatiques essentielles où les données analysées en sortie d'une étape *n* deviendront les données à analyser en entrée de l'étape *n + 1*. Afin de permettre un accès au biologiste à l'outil

développé, ces pipelines analytiques pourront être intégrés au sein d'interfaces conviviales permettant de s'affranchir de systèmes fonctionnant par ligne de commandes.

Galaxy est un des workflow les plus complexes (Taverna, Moby, GenePattern). Le Galaxy utilisé dans cette étude est un logiciel possédant de nombreux outils en lien avec d'autres sites web (centralisation d'outils) comptant parmi les plus utilisés. Cette centralisation des outils évite l'utilisation parallèle de plusieurs sites web (Pond *et al.*, 2009). Aujourd'hui, il ne nous manque pas d'outils de bioinformatique mais leur utilisation reste encore difficilement accessible. Il faut la connaissance et l'expérience pour s'assurer du choix des bons outils en fonction des besoins et un bon niveau de connaissance en bioinformatique pour pouvoir les utiliser. Mais plus que l'application des outils, il faut que les résultats des analyses bioinformatiques soient reproductibles et pour cela, il faut que les workflows soient suffisamment détaillés afin qu'ils puissent être reproduits par d'autres chercheurs (*Reproducible Research Publisher, RRP*) après publication dans les journaux scientifiques. En effet, si la méthode d'analyse des données est intéressante, elle reste trop peu souvent reproductible (Mesirov, 2010). Il existe déjà des *pipelines* spécifiques pour les pathogènes viraux (Chiu, 2013). Les Figure 27 et 28 montrent la chute du coût du séquençage à haut-débit et l'augmentation considérable du nombre d'articles publiés chaque année sur la période 2005 - 2013. En termes de coût d'analyse, les données issues de séquençage, restent toujours onéreuses. La baisse du coût de séquençage ne compense donc pas le coût d'analyse de données (Caboche *et al.*, 2014).

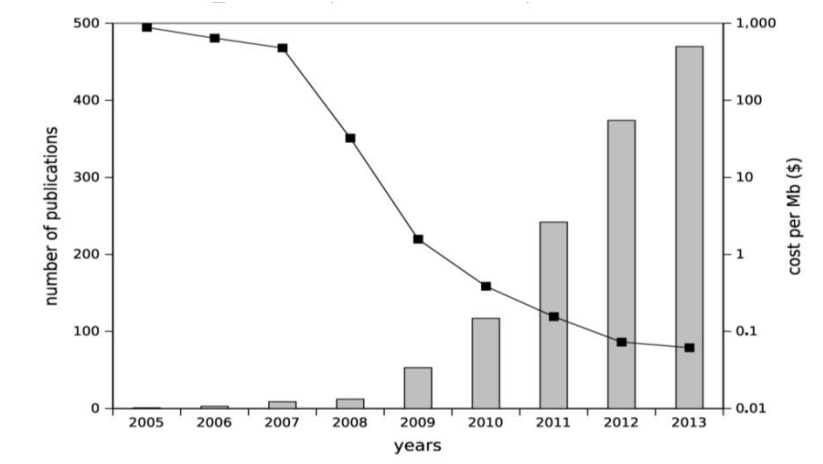


Figure 27 : Requête dans PUBMED des pipelines d'analyses de bioinformatiques publiés depuis 1998. Baton gris : nombre de publications, ligne avec petit carré noir : prix du séquençage par Mb (\$) (Caboche *et al.*, 2014)

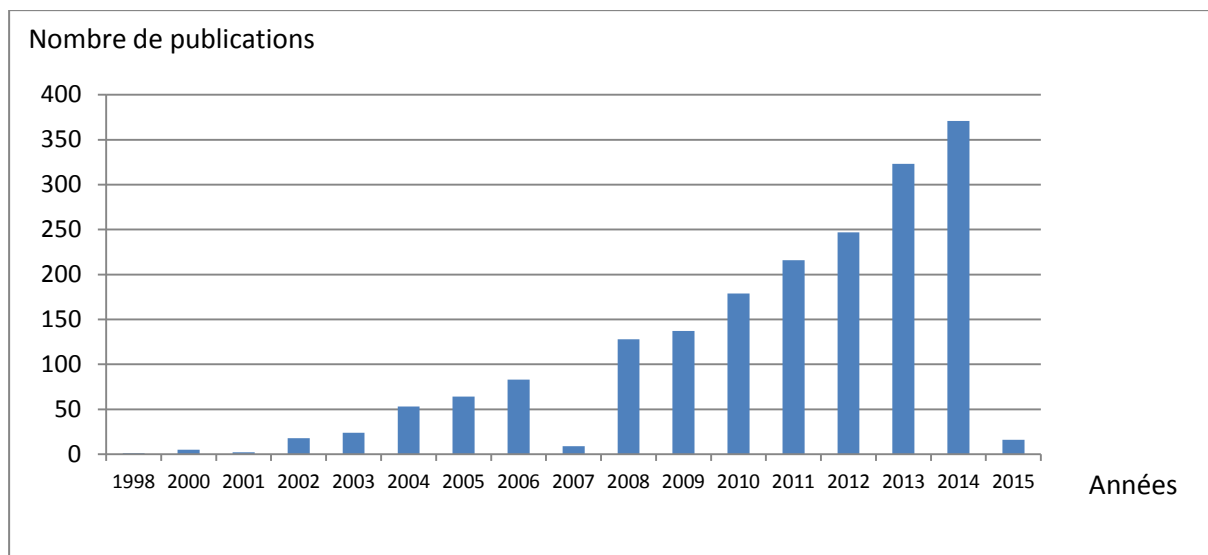


Figure 28 : Requête dans PUBMED des pipelines d'analyse de bioinformatiques publié depuis 1998. Les bâtons bleus représentent le nombre de publications.

Enfin, ces outils bioinformatiques peuvent être difficilement utilisés comme des outils de routine pour le diagnostic en laboratoire d'analyse médicale. Ceci est vrai malgré toute l'expérience d'Illumina et de son séquenceur MiSeqDx proposant le premier système agréé par la FDA en intégrant une phase de bioanalyse pour le diagnostic génomique des patients atteints de mucoviscidose (http://www.illumina.com/clinical/diagnostics/cystic_fibrosis/kits.html).

Aujourd'hui, considérant le coût d'identification et surtout le traitement des données de séquences produites après l'analyse, l'utilisation de cette technologie n'est pas encore à la portée de tous. Malgré tout, l'évolution du coût de séquençage a permis de rendre accessible à un grand nombre de sujets d'études et de laboratoires, cette technologie à des débits qui permettent de couvrir un très large spectre d'applications.

Parallèlement au développement du séquençage à haut-débit, la bioinformatique s'est très largement développée pour permettre de répondre au défi des méga-données. De plus en plus des *pipelines* d'analyse bioinformatique en libre accès permettent aux non experts d'utiliser un grand éventail d'applications. Si l'utilisation du séquençage haut-débit est encore confinée à des plateformes ou laboratoires spécialisés, à l'avenir, son usage pourrait devenir plus courant voire routinier allant même jusqu'à intégrer le milieu hospitalier à des fins de diagnostic (Audebert *et al.*, 2014).

Objectifs de thèse

Comme mentionné dans l'introduction, cette thèse s'intègre dans le programme ANR *Fish-parasites*. L'objectif final de cette thèse est d'acquérir et de structurer des données de prévalence des parasites de poisson potentiellement pathogènes pour l'Homme présents dans les espèces couramment consommées en France. Pour atteindre cet objectif, le travail a été divisé en trois axes : l'échantillonnage et l'analyse des poissons (effectué également en partie par d'autres partenaires du projet), le développement d'outils d'identification et enfin l'analyse des données de l'ensemble du programme.

Premier axe : l'objectif était d'analyser un échantillonnage de différentes espèces de poissons provenant de différentes zones de pêche et de collecter les parasites appartenant à la famille des Anisakidae.

Deuxième axe : Pour obtenir des données biologiques avec un niveau de précision allant jusqu'à l'espèce des parasites, l'identification morphologique a été couplée avec une méthode d'identification moléculaire par séquençage *Sanger*. Cependant, face aux quantités considérables de parasites isolés, ces méthodes n'étaient pas adaptées pour identifier de façon exhaustive l'ensemble des Anisakidae isolés. C'est ainsi que la technologie de séquençage à haut-débit a été sélectionnée et le développement et la validation des différentes étapes sont devenus un objectif majeur de cette thèse. Afin de développer cet outil d'identification des Anisakidae en séquençage à haut-débit suivi par le BLAST local, la première tâche a été de créer une base de données de séquences de référence d'Anisakidae afin de pouvoir interroger les résultats de séquençage localement. Ensuite, la conception d'amorces d'une longueur adaptée à la technologie de séquenceur, l'extraction d'ADN à partir de mélanges d'Anisakidae et enfin la préparation des matrices de séquençage ont été mises au point. Le développement d'un *pipeline* d'analyse bioinformatique en collaboration avec des bioinformaticiens a permis d'identifier les séquences d'ADN des Anisakidae obtenus par comparaison avec des séquences de référence sur le web-service Galaxy. La dernière étape de cet axe a visé à quantifier le nombre de copies d'ADN mitochondrial des Anisakidae afin de convertir les proportions de séquences obtenues en nombre relatif d'Anisakidae. Une cellule possédant plusieurs mitochondries comportant chacune une copie du gène *COX2*, de nombreuses copies de ce gène sont donc présentes dans une cellule et dans un organisme métazoaire. D'un point de vue de la santé publique, il était important que les résultats semi-quantitatifs du séquençage haut débit puissent être traduits en nombre relatif de parasites.

Troisième axe : l'ensemble des données du programme *Fish-Parasites* a été analysé afin d'évaluer la contamination en Anisakidae des poissons couramment consommés en France. Dans un premier temps, une analyse descriptive des données a été réalisée. Ainsi, des données sur la prévalence, la répartition géographique, le spectre d'hôtes et l'intensité des différentes espèces d'Anisakidae ont été obtenues. L'analyse statistique a été réalisée en collaboration avec l'équipe de statisticiens et épidémiologistes impliqués dans *Fish-Parasites*. Afin d'obtenir les tendances au niveau de la contamination et de connaître les facteurs influençant la prévalence d'Anisakidae dans ces poissons, une analyse des correspondances multiples, une analyse statistique logistique univariée ainsi qu'une analyse multivariée ont été appliquées aux données.

Le travail est présenté dans les quatre grandes parties développées ci-après.

Matériels et méthodes

I. Echantillonnage des espèces de poisson, collecte des parasites et choix des méthodes permettant leur identification

I.1. Echantillonnage

Le plan d'échantillonnage du programme *Fish-Parasites* a été établi suite à une analyse de type *risk-ranking*. Les données de consommation annuelle des produits de la pêche (FranceAgrimer, 2011) et les données de la proportion consommée par repas pour les produits frais, réfrigérés et marinés issues de l'étude CALIPSO (Étude des Consommations Alimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, Polluants et Oméga 3. Document AFSSA, 2006.) ont été associées aux données de prévalence, issues de la littérature, des Anisakidae dans les espèces de poisson pour permettre d'effectuer l'analyse.

Cette analyse a été effectuée par des épidémiologistes de l'Anses DER UEA, Unité Méthodologie et études (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail Direction de l'Evaluation des Risques, Unité d'Etude et Appui en Microbiologie et Santé Animale).

Au total, 5 500 individus de 15 espèces principales ont été prévus. Le nombre de lot par espèces a été déterminé en fonction de niveau de classement dans le *risk-ranking*. Plus l'espèce présentait de risque, plus le nombre de lots était important. Les lots devaient être constitués de 30 à 40 poissons en faisant varier l'origine géographique, la saison et la période de reproduction. Les espèces sélectionnées étaient les suivantes : cabillaud, saumon atlantique, merlu, lieu noir, lingue bleue, lotte, maquereau commun, hareng, sole, merlan, bar, lieu jaune, sardine, anchois et églefin. En raison de la faisabilité et du budget, à la fin du programme, 1 795 poissons appartenant à 15 espèces prévues et 16 autres espèces imprévues ont été collectés et disséqués. L'échantillonnage a été réalisé en mer et à terre via les mareyeurs et autres distributeurs.

- Les prélèvements en mer permettaient d'obtenir des poissons frais et non éviscérés. Les espèces étaient le hareng, le maquereau commun, le merlan, la baudroie, la sardine, l'anchois et le merlu. Les prélèvements ont été réalisés lors de campagnes scientifiques effectuées à bord des navires océanographiques de l'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'exploitation de la mer. Plusieurs zones ont été échantillonnées: le sud de la mer du nord, le golfe de Gascogne, la mer Celtique, la Manche et le golfe du Lion. Le prélèvement d'une même zone a été prévu deux à trois fois pendant le programme mais en raison de la faisabilité, certaines espèces n'ont pas pu être échantillonnées plusieurs fois. De plus, plusieurs espèces en dehors du plan ont également été échantillonnées mais en très petit nombre ; la dorade grise, l'orphie commune, le grondin gris, le bar tacheté, la

plie commune, la limande commune, la cardine franche, la bonite à dos rayé, le tacaud, la lingue franche, le chinchard à queue jaune, le maquereau espagnol, le requin-hâ, la baudroie rousse, le merlan bleu et le poisson lune (Annexe 2).

- L'échantillonnage effectué à terre a permis de compléter les échantillons en mer. Des lots de poissons ont été achetés auprès de différents acteurs : pêcheurs, mareyeurs, importateurs, enseignes de grande et petite distribution.

Tous les échantillons de poisson prélevés sont décrits dans le Tableau X. Durant les campagnes en mer, un total 705 poissons ont été échantillonnés contre 895 poissons à terre, 40 saumons de l'aquaculture en Atlantique et 40 bars de mer Méditerranée. Concernant le lieu jaune, il a été difficile d'obtenir des échantillons débarqués à Boulogne sur Mer. Les effectifs ne sont que de 3 poissons.

La localisation des parasites dans les différentes localisations corporelles du poisson, leur nombre, les données biométriques des poissons (taille, poids, sexe, etc.) ainsi que des données environnementales (date et lieu de pêche) ont été relevées et consignées dans la base de données PARAFISH (Annexe 3), qui a été développée pour les besoins du programme par l'Anses (Maisons-Alfort). L'échantillonnage des poissons selon le plan établi a été mené à bien grâce au travail de tous les partenaires impliqués ; l'Ifremer, l'Anses (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail, département des produits de la pêche, Boulogne sur mer), l'équipe BDPEE (Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents de l'Institut Pasteur de Lille) et la Plate-forme d'innovation Nouvelles Vagues. Le prélèvement des poissons en eau douce a été effectué par l'équipe de l'hôpital Cochin, Paris.

Tableau X : Récapitulatif des 15 espèces de poisson échantillonnées durant le programme *Fish-Parasites* classées par ordre décroissant du nombre d'individus prélevés.

Les 15 espèces de poisson prévues dans le plan				
Nom latin	Nom commun	Type d'échantillonnage	Nombre de poisson	Total
<i>Merlangius merlangus</i>	merlan	A terre	120	170
		Campagne en mer	50	
<i>Merluccius merluccius</i>	merlu commun/ merlu/ colin/ merlu (colin) pour le préemballé	A terre	30	152
		Campagne en mer	122	
<i>Engraulis encrasicolus</i>	anchois commun/ anchois	Campagne en mer	146	146
<i>Gadus morhua</i>	morue commune/ morue/ cabillaud (frais ou surgelé)/ morue (salée)	A terre	108	140
		Campagne en mer	32	
<i>Sardina pilchardus</i>	sardine commune	A terre	30	126
		Campagne en mer	96	
<i>Clupea harengus</i>	hareng commun/ hareng	A terre	90	121
		Campagne en mer	31	
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	églefin/ haddock (fumé)	A terre	73	121
		Campagne en mer	48	
<i>Scomber scombrus</i>	maquereau commun/ maquereau	A terre	30	121
		Campagne en mer	91	
<i>Lophius piscatorius</i>	baudroie commune/ lotte/ baudroie	A terre	60	113
		Campagne en mer	53	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	bar commun/ loup/bar	A terre	90	106
		Campagne en mer	16	
<i>Solea solea</i>	sole commune/ sole	A terre	90	106
		Campagne en mer	16	
<i>Molva dypterygia</i>	lingue bleue/ langue	A terre	94	94
<i>Pollachius virens</i>	lieu noir/ lieu/ colin	A terre	80	81
		Campagne en mer	1	
<i>Molva molva</i>	Lingue franche	A terre	48	48
<i>Salmo salar</i>	saumon atlantique/ saumon	A terre(Aquaculture)	40	40
<i>Pollachius pollachius</i>	lieu jaune	Campagne en mer	3	3
Total			1688	

Les poissons provenaient des zones majeures de pêche FAO (Food and Agriculture Organization) 27 Atlantique Nord-Est (Figure 29) et 37 mer Méditerranée et mer Noire (Figure 30) définies par le CIEM (Conseil International pour l'Exploration de la mer) ICES (International Council for the Exploration of the Sea). Les quinze espèces de poissons dans le plan d'échantillonnage sont présent en fonction des sous-zones de pêche dans le Tableau XI.

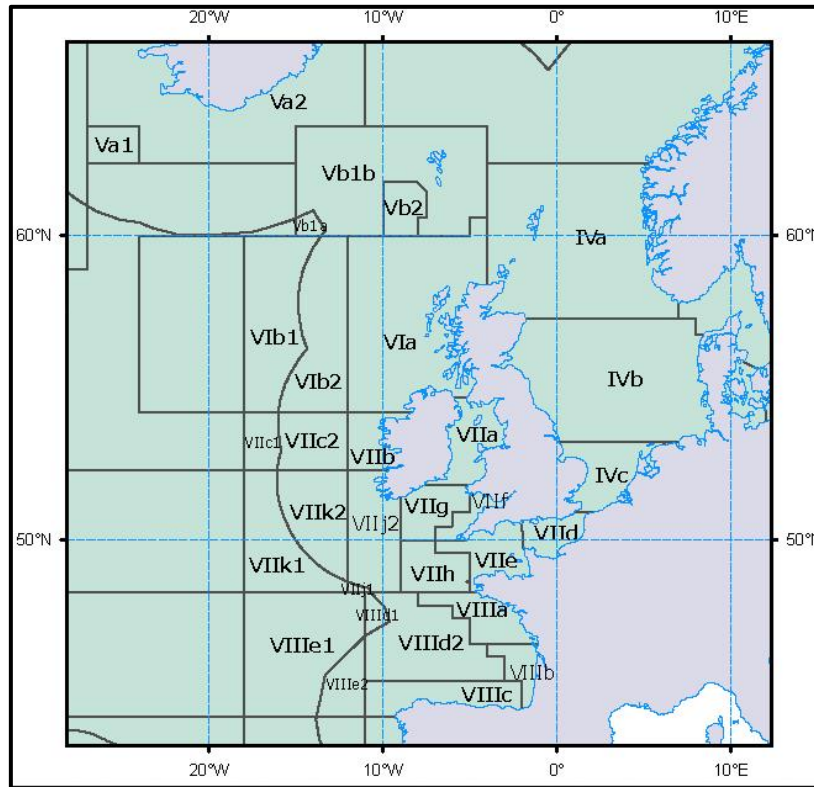


Figure 29 : Zone de pêche FAO 27 Atlantique Nord-Est
 IV : mer du Nord, V : Islande et îles Féroé, VI : Rockall, Côte Nord-Ouest de l'Écosse et Irlande du Nord,
 VII : Ouest de l'Irlande et banc de Porcupine, VIII : golfe de Gascogne.

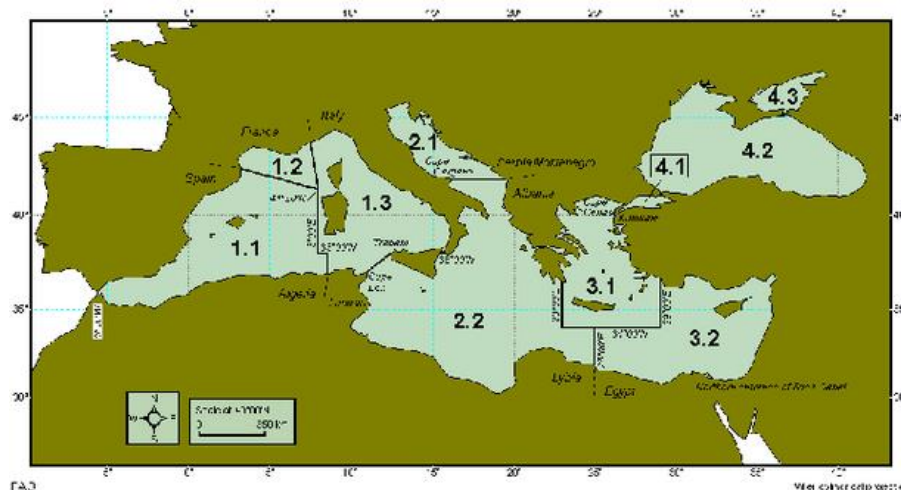


Figure 30 : zone de pêche 37 mer Méditerranée et mer Noire.
 1 : Ouest de la mer Méditerranée, 2 : Centre de la mer Méditerranée, 3 : Est de la mer Méditerranée et 4 : mer Noire.

Tableau XI : Espèces de poisson prévues dans le plan d'échantillonnage en fonction des zones de pêche.

15 espèces de poisson dans le plan																	Nombre d'espèces de poissons pour une zone de pêche	
zones	Sous-zones	Divisions et sous-divisions	<i>Merlangius merlangus</i>	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>Engraulis encrasicolus</i>	<i>Godus morhua</i>	<i>Sardina pilchardus</i>	<i>Clupea harengus</i>	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	<i>Scomber scombrus</i>	<i>Lophius piscatorius</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Solea solea</i>	<i>Molva dypterygia</i>	<i>Pollachius virens</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Pollachius pollachius</i>	
27	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	12
	27-2	-														x		1
	27-4	27-4-a mer du Nord Nord							x						x			2
		27-4-b mer du Nord centrale	x			x		x					x					4
		27-4-c mer du Nord Sud	x			x		x					x					4
	27-5	27-5-b-1 Eaux féringiennes															x	1
	27-6										x							1
	27-7	27-7-d Manche Est	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	12
		27-7-e Manche Ouest		x					x		x							3
		27-7-g mer Celtique Nord		x		x			x		x							4
		27-7-h mer Celtique Sud		x		x			x		x							6
		27-7-j Sud-ouest de l'Irlande - est		x		x			x		x							4
	27-8	27-8-a golfe de Gascogne - nord	x		x	x	x	x	x	x	x	x						8
		27-8-b golfe de Gascogne - central	x		x	x	x	x	x	x	x	x						7
		27-8-c Sgolfe de Gascogne - sud		x		x			x									3
		27-8-d golfe de Gascogne - large							x		x							2
37	37-1	37-1-2 golfe du Lion		x		x			x		x							5
Totale zone de pêche pour une espèce de poisson			7	9	5	8	5	4	9	6	10	5	4	1	3	1	2	

27 océan Atlantique Nord-Est, 27.II mer de Norvège, Spitzberg et île aux Ours, 27.IV mer du Nord, 27.V Eaux islandaises et féringiennes, 27.VI Rockall, côte nord-ouest de l'Écosse et nord de l'Irlande; ou Ouest Ecosse, 27.VII mer d'Irlande, ouest de l'Irlande, Porcupine Bank, Manche orientale et occidentale, canal de Bristol, mer Celtique Nord et Sud, et sud-ouest de l'Irlande - est et ouest, 27.VII golfe de Gascogne, 37 mer Méditerranée et mer Noire, 37.1 mer Méditerranée occidentale. Les croix indiquent les zones dans lesquelles chaque espèce a été échantillonnée. Les espèces sont dans l'ordre de la quantité échantillonnée décroissante.

Les lots d'une espèce de poissons pouvaient provenir de différentes zones, sous-zones ou divisions de pêche telles que définies par la FAO (<http://www.fao.org/fishery/area/search/fr>). Ainsi par ordre décroissant, la baudroie provenait de 10 zones, le merlu et l'églefin de 9 zones, le cabillaud de 8 zones, le merlan de 7 zones, le maquereau de 6 zones, la sardine, l'anchois et le bar de 5 zones, le hareng et la sole de 4 zones, les lieu noirs et jaunes de 2 zones et enfin la lingue bleue d'une seule zone. Le saumon atlantique a été obtenu auprès d'un élevage de Norvège. Concernant les zones de pêche, 12 espèces de poissons provenaient de la zone Est de la Manche, soit lors de campagnes soit lors d'achats à terre. Huit espèces ont été pêchées dans le nord du golfe de Gascogne, 7 espèces dans le centre du même golfe, 6 espèces ont été capturées dans le sud de la mer Celtique, 5 dans le golfe du Lion et entre 1 et 4 espèces pour les zones restantes. Pour certains lots de poisson, les données géographiques n'ont pas été obtenues, seule la zone 27 (Atlantique Nord-Est) est indiquée dans le Tableau XI. Les images des 18 espèces de poissons dans cette étude sont dans l'

Annexes

Annexe 1.

I.2. Protocole de dissection des poissons

Le protocole de dissection des poissons prélevés en mer ou à terre a été standardisé entre tous les partenaires. Un lot de poisson contenait entre 30 et 45 poissons sauf pour certains lots issus des campagnes scientifiques (EVH, IBT, PEG). L'enregistrement des données de zone et date de pêche, la mesure du poids et de la taille, le calibre de chaque individu a été effectué dans la base PARAFISH. Un numéro a été attribué à chaque poisson. La numérotation des lots a été réalisée comme indiqué dans le Tableau XII.

Tableau XII : Numérotation des échantillons

Numérotation	Nombre de lot
MGBF 501-1352	27
EVH 4101-4394	97
IBT 4851- 4997	41
IF 2601- 2699	3
PEG 001-161	21
PEM 3501-3747	14

MGBF : Mélanie Gay Bruno Le Fur (prélèvement à terre), EVH : EVHOE (EValuation Halieutique de l'Ouest de l'Europe, campagne scientifique), IBT : IBTS (International Bottom Trawl Survey, campagne scientifique), IF : Ifremer (prélèvement à terre), PEG : PELGAS (PELagiques GAScogne, campagne scientifique), PEM : PELMED (PELagique MEDiterranée, campagne scientifique)

La Figure 31 représente le schéma de la dissection et le prélèvement des échantillons pour l'identification des différents parasites.

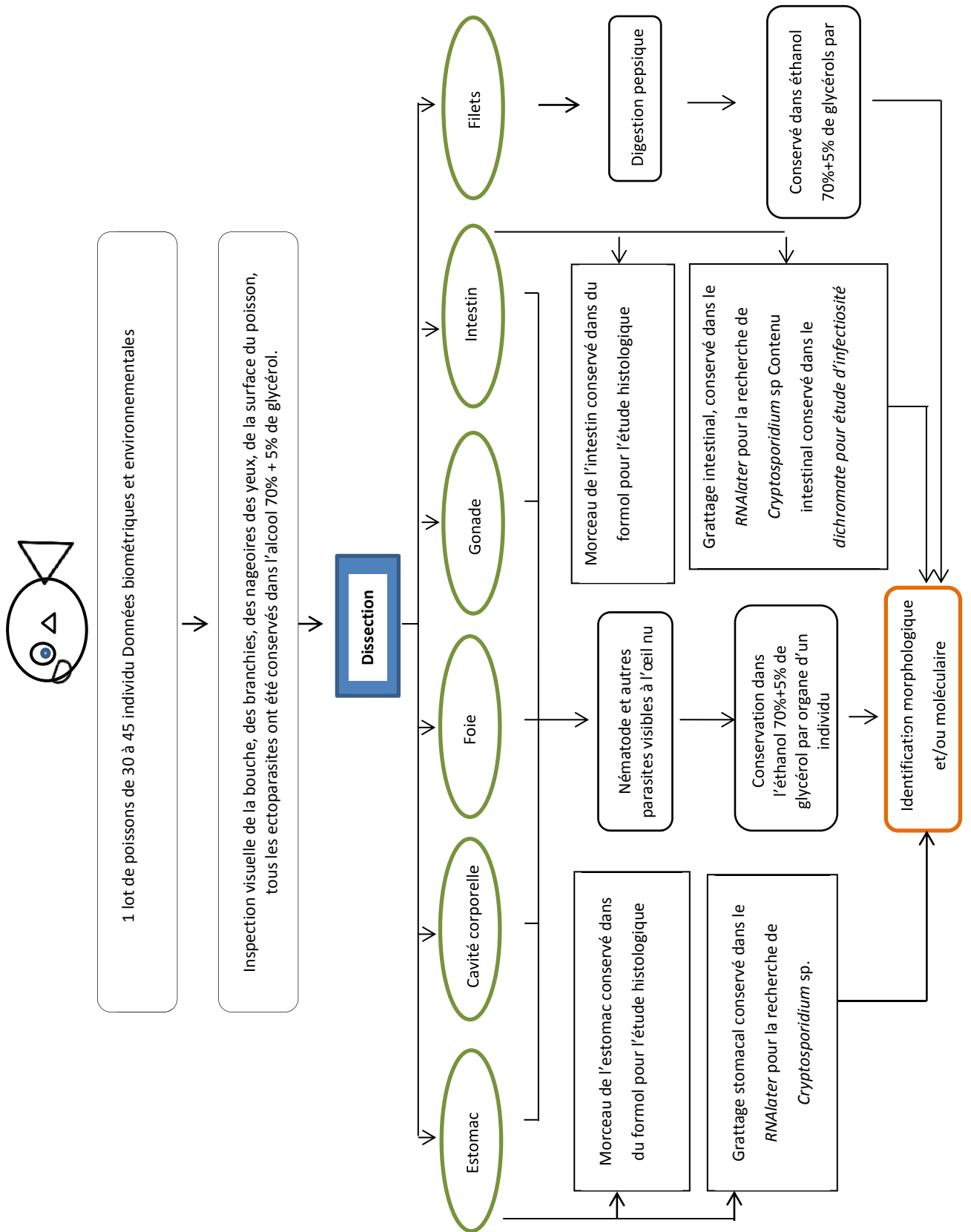


Figure 31 : Diagramme des étapes de dissection du poisson comprenant les différents prélèvements pour la détection et l'identification des différents parasites. Un lot de 30 à 45 poissons est prélevé d'une zone de pêche. Les différentes localisations corporelles du poisson sont entourées en couleur verte.

Chaque localisation corporelle de chaque individu (poisson) a été traitée séparément. Dans cette étude le terme « localisation corporelle » va être utilisé pour désigner les différentes parties de poissons au lieu du terme organe, qui peut ne pas être approprié, comme dans le cas de la cavité corporelle qui n'est pas un organe au sens strict du terme. Tous les parasites collectés à partir d'une localisation corporelle issue d'un poisson représentaient un échantillon. Les définitions de chaque localisation corporelle de poisson et leur code étaient les suivants :

- FI pour *fillets* : les parasites étaient dans la chair
- CC : *corporal cavity* (la cavité corporelle : les parasites se trouvaient dans la cavité ventrale, le mésentère, sur la surface des caeca pyloriques, de l'estomac, de l'intestin et des gonades)
- LI : *liver* (les parasites étaient dans le foie et/ou à sa surface)
- BO: *bowel* (les parasites étaient dans l'intestin y compris dans la paroi intestinale et les caeca pyloriques)
- ST : *stomach* (les parasites étaient dans l'estomac et/ou dans la paroi stomacale)
- GO : *gonad* (les parasites étaient dans les gonades)
- OC : *oral cavity* (les parasites étaient dans la bouche)
- GI : *gill* (les parasites étaient dans les branchies)
- BS : *body surface* (les parasites étaient sur la surface corporelle)

Le prélèvement a commencé par l'inspection visuelle de la surface du poisson, des branchies, de la bouche, de l'œil et des nageoires. Ensuite le poisson a été disséqué. Les différentes localisations corporelles comme la cavité corporelle, le foie, l'intestin, l'estomac et les filets ont été examinés séparément.

Les filets ont été analysés après avoir subi une digestion pepsique. Le protocole est le suivant : 200 g de chair de poisson ont été digérés dans 500 mL d'une solution pepsique (5 g de pepsine et 63 mL d'HCl à 1 M dans 937 mL d'eau) à 37 °C dans un bécher de 2 L sous agitation. Quand toute la chair a été digérée, les parasites étaient obtenus par passage du liquide sur tamis.

Les parasites ont été lavés dans l'eau physiologique et conservés dans l'alcool 70 % + 5 % glycérol séparément pour chaque échantillon. Ce mélange a été choisi pour optimiser la conservation de l'échantillon avant son traitement. Le nom et le nombre de parasites observé pour chaque échantillon ont été enregistrés sur la feuille de paillasse.

Les grattages d'estomac et d'intestin pour la recherche de *Cryptosporidium* sp. ont été conservés dans le *RNAlater*.

Le prélèvement des contenus intestinaux, des tissus stomacaux et intestinaux pour la détection de *Cryptosporidium* sp. a également été prévu. De plus, le prélèvement de *Blastocystis* sp. est également très intéressant mais le prélèvement n'a été réalisé qu'à la fin pour les poissons du programme *Fish-Parasites*. Ce protozoaire a donc été inclus au programme *ABC-Fish*. Cette tâche a été menée par des méthodes de biologie moléculaire et/ou histologique disponibles au sein de l'équipe BDPEE de l'Institut Pasteur de Lille.

I.3. Choix des méthodes moléculaires pour l'identification des Anisakidae dans les poissons

Au départ, il a été prévu d'identifier morphologiquement les nématodes et autres parasites afin de déterminer le genre. L'identification au niveau de l'espèce a été réalisée grâce à une méthode moléculaire appropriée. Les Anisakidae (*Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium*) ont été analysés en priorité en fonction du danger. Ils ont été identifiés individuellement au niveau de l'espèce en utilisant une *PCR* sur un fragment du locus *COX2* (Valentini *et al.*, 2006). Ensuite, les échantillons amplifiés ont été envoyés à un prestataire extérieur pour réaliser un séquençage *Sanger*.

Au fur et à mesure, la découverte d'un nombre important de parasites dans certains lots de poisson, dans la lingue bleue par exemple, atteignant 10^3 à 10^4 parasites dans certains de leurs localisations corporelles, a rendu l'identification morphologique et moléculaire individuelle fastidieuse. Ainsi, la méthode de séquençage à haut débit a été adoptée pour identifier plus rapidement les nématodes collectés. Cet outil existant pour d'autres applications permet également de diminuer le coût par rapport aux techniques actuelles qui reposent sur le séquençage des fragments d'ADN provenant de chaque nématode individuellement. Ainsi, de grandes quantités de données ont pu être générées et utilisées dans des analyses épidémiologiques et d'évaluation du risque. Les échantillons prioritaires en fonction du risque pour le consommateur sont les filets, la cavité corporelle et le foie.

Les échantillons ont donc été séparés en deux groupes pour des raisons de rapidité, de budget et de temps d'analyse Figure 32.

- Lorsqu'il y avait moins de 11 nématodes par échantillon, les extractions d'ADN ont été réalisées nématode par nématode en utilisant le kit Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, USA) pour ensuite effectuer la *PCR* en point final au locus *COX2*. Les échantillons positifs en *PCR* ont été alors envoyés en séquençage *SANGER*.
- A partir de 11 nématodes par échantillon, les individus collectés au sein d'un échantillon ont été extraits en pool en utilisant le kit Macherey-Nagel (Genomic DNA and total RNA purification NucleoBond AXG Columns). Ils ont ensuite été amplifiés par *PCR* en point final

mais cette fois-ci les amorces ciblant le locus *COX2* portaient des index. Les échantillons positifs ont été dirigés vers le séquençage à haut-débit ciblé. Les séquences obtenues étaient ensuite implémentées dans un *pipeline* d'analyse.

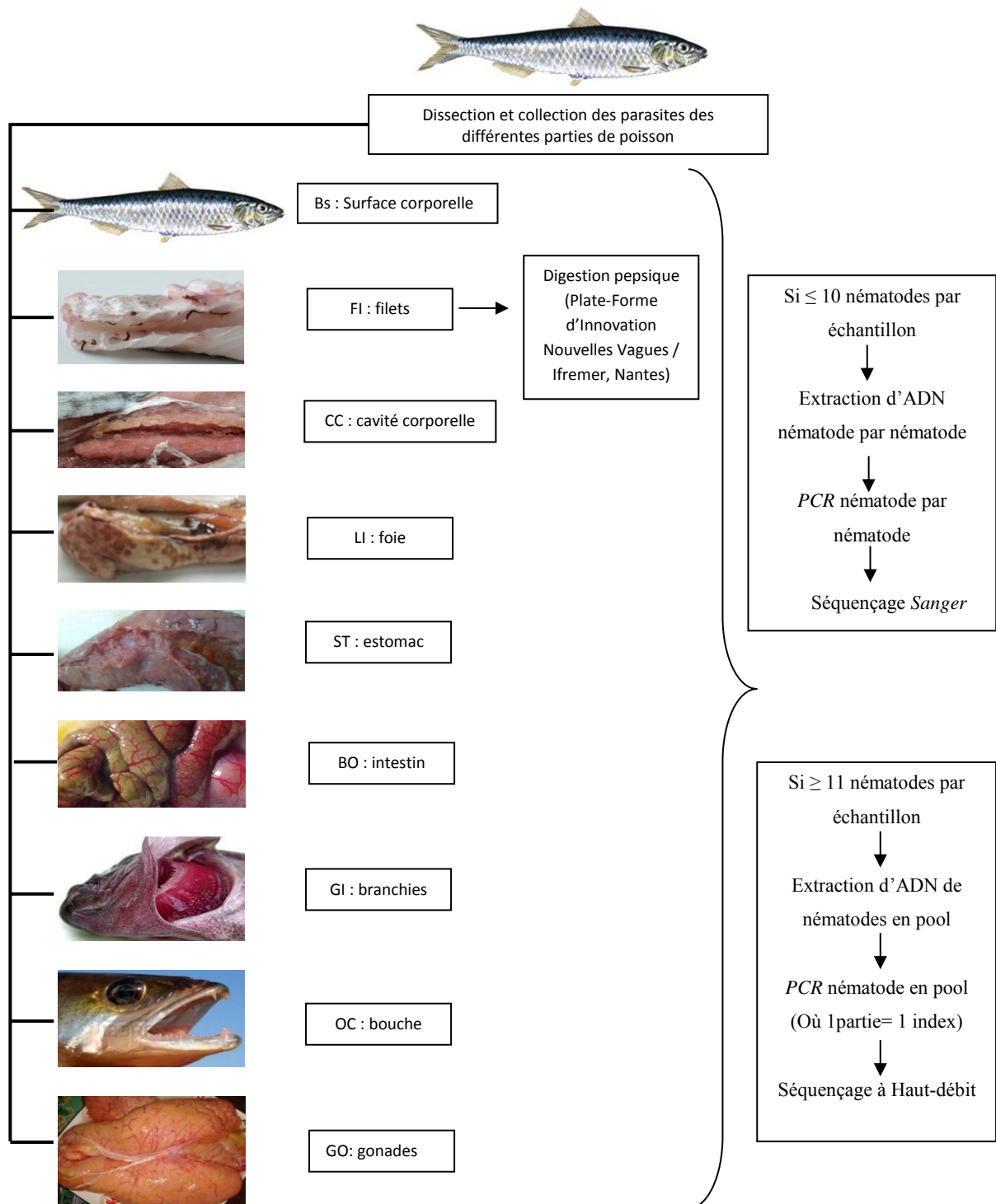


Figure 32 : Schéma de la prise de décision quant à la méthode d'identification choisie en fonction du nombre de nématodes. Un échantillon est l'ensemble des nématodes provenant d'une localisation corporelle (filets, cavité corporelle, foie et tube digestif) d'un poisson donné.

II. Identification des Anisakidae par la méthode de séquençage *Sanger* pour le locus *COX2*

Cette partie décrit les différentes étapes pour réaliser l'identification moléculaire des parasites en individuel.

II.1. Extraction d'ADN en vue du séquençage *Sanger*

Les échantillons ont été extraits pour partie à l'Ifremer de Nantes et pour partie à l'Anses de Boulogne sur mer. Le kit *Wizard®SV Genomic DNA Purification System* (Promega, France) a été utilisé pour extraire l'ADN de chaque nématode selon la méthode suivante. Chaque parasite a été broyé avec un piston en plastique par microtube. Deux cent soixante-quinze microlitres du mélange réactionnel de solution de lyse (200 μ L Nuclei lysis solution, 50 μ l EDTA 0.5 M, 20 μ L de Protéinase K 20 mg.mL⁻¹, 5 μ L de RNase A 4 mg.mL⁻¹) ont été ajoutés à chaque microtube de 1,5 mL contenant un parasite (maximum 20 mg de tissu). L'ensemble a été incubé à 55 °C pendant 16 à 18 h. Deux cent cinquante microlitres de tampon *Wizard SVLysis* ont été ajoutés et l'ensemble a été mélangé par vortex. Le lysat en résultant a été transféré dans une mini colonne *Wizard SV* placée sur un microtube propre puis centrifugé 3 min à 13 000 g. Le principe se base sur le filtre silica présent sur la colonne et retenant l'ADN soluble présent dans le lysat. Le liquide a été éliminé et la mini-colonne a été replacée sur le microtube. Six cent cinquante microlitres de solution *Wizard SV Wash* ont été ajoutés afin de laver l'ADN retenu sur la membrane de la mini-colonne et l'ensemble a été centrifugé 1 min à 13 000 g. Le liquide a été éliminé et la mini colonne a été replacée sur le micro-tube. Ce lavage a été répété 4 fois puis suivi d'une centrifugation finale de 2 min à 13 000 g. La mini-colonne a été mise sur un micro tube de 1,5 mL propre et 100 μ L d'eau exempte de nucléase (*Nuclease-Free water*, Quiagen, France) ont été ajoutés sur la mini-colonne afin d'éluer l'ADN. L'ensemble a été incubé 2 min à température ambiante puis centrifugé 1 min à 16 000 g. Cette dernière opération a été répétée une deuxième fois suivie d'une centrifugation finale de 2 min à 13 000 g. L'ADN élué a été dosé à l'aide d'un *Biophotometer* (Eppendorf, France) pour mesurer la quantité et la qualité de l'ADN qui a ensuite été conservé à - 20 °C.

II.2. Protocole d'amplification

La *PCR COX2* (Valentini *et al.* 2006) permet d'amplifier un fragment de 630 pb du gène mitochondrial du cytochrome oxydase 2. Les amorces utilisées étaient *COX2 210 (forward)* 5'-CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC-3' et *COX2 211 (reverse)* 5'-TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT-3'. Le mélange réactionnel pour une *PCR* d'un volume total de 50 μ L était composé de : 31.1 μ L d'eau ultra pure, 5 μ L de Tampon 10X, 5 μ L de MgCl₂ 25 M, 2 μ L de dNTPs 10 mM, 0.6 μ L d'amorce *forward 210* 50 μ M, 0.6 μ L d'amorce *reverse 211* 50 μ M, 2.5 μ L de DMSO 14.1 M, 1 μ L de Taq DNA polymérase 5 U. μ L⁻¹(*HotStarTaq polymerase*, Qiagen, France), 2 μ L de matrice ADN. Les étapes de la *PCR* sont:

une dénaturation initiale de 3 min à 94 °C ; 34 cycles comprenant une dénaturation de 30 sec à 94 °C, une hybridation d'1 min à 46 °C et une élongation d'1 min 30 sec à 72 °C ; une élongation finale de 10 min à 72 °C.

Les produits de *PCR* ont été révélés après électrophorèse en gel d'agarose à 1 % en TBE (Tris Borate EDTA) 1X contenant du Bromure d'Ethidium à 3,5 %. Un volume de 14 µL de produit de *PCR* et 3 µL de tampon de charge 6X ont été déposés dans chaque puits. Quatorze microlitres de marqueur (SmartLadder, Eurogentec, France) ont été déposés dans le premier et le dernier puits de chaque gel. L'électrophorèse des produits de *PCR* était effectuée pendant 1h 30 à 120 V. Les photos des gels sous UV ont été prises dans une chambre noire, sur table UV à l'aide d'une caméra et du logiciel GelDoc (Biorad).

II.3. Séquençage des produits amplifiés et identification des parasites

Les produits de *PCR* positifs ont été envoyés pour séquençage à un prestataire extérieur. Chaque produit de *PCR* a été séquençé dans les deux sens. Les séquences complémentaires d'un même produit amplifié ont été comparées de façon à corriger les éventuelles erreurs de séquençage sur le logiciel Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) et à obtenir une séquence "consensus" pour chaque individu analysé. Cette séquence consensus a été comparée aux séquences déposées dans GenBank en utilisant le programme Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, BLAST (Altschul *et al.*, 1990) afin d'identifier l'espèce d'Anisakidae à laquelle l'individu appartient.

III. Identification des Anisakidae par la méthode de séquençage à haut débit au locus *COX2*

L'identification moléculaire des nématodes par séquençage à haut-débit a nécessité le développement de différents outils adaptés à la technologie de PGM™ Ion Torrent (Life Technologies). La Figure 33 schématise les différents étapes de développement des outils nécessaires tels que l'extraction d'ADN en pool, le design des amorces, la préparation de la matrice de séquençage (*PCR* barcoding ou indexée et l'amplification clonale), un pipeline d'analyse intégrant l'élaboration d'une base de données curée et alignée. Le *pipeline* d'analyse a été développé en collaboration avec des bioinformaticiens de la société Gènes Diffusion, une couche d'interface Galaxy a permis de le rendre utilisable.

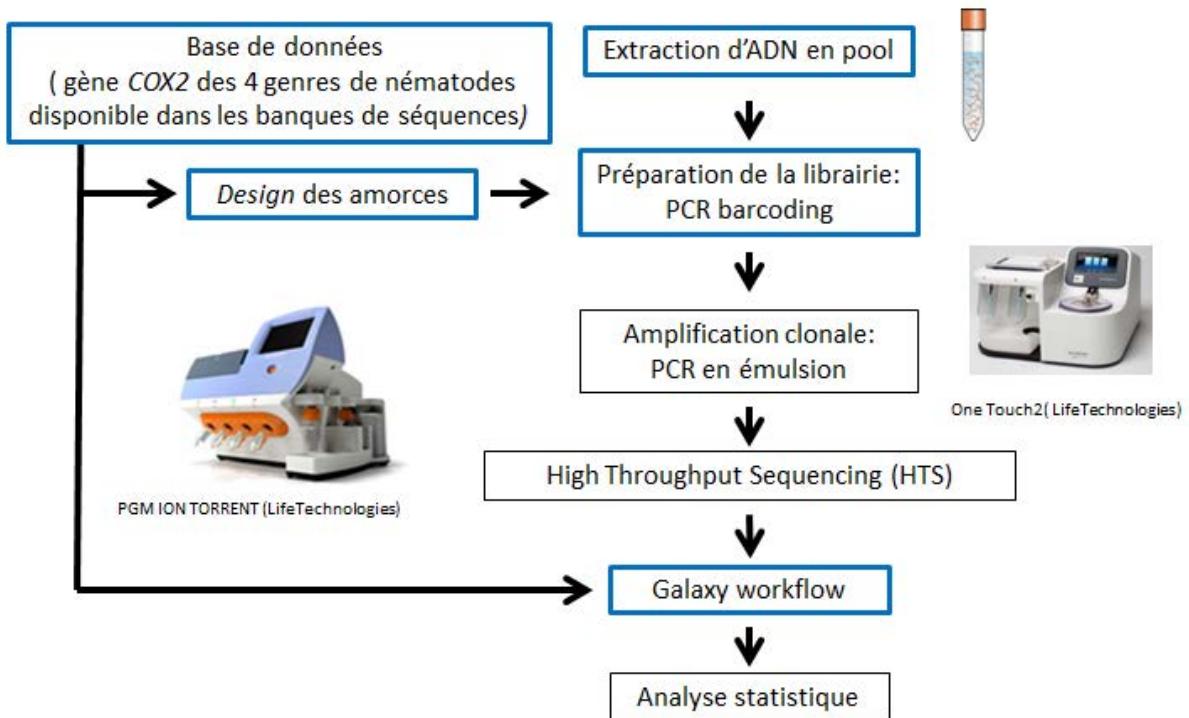


Figure 33 : Schéma global du développement des différentes étapes du séquençage à haut-débit pour l'identification moléculaire des nématodes. Les étapes développées en parallèle sont encadrées en bleu.

III.1. Base de données de séquences du gène mitochondrial *COX2*

Les séquences nucléotidiques du gène *COX2* des quatre genres d'Anisakidae ont été collectées auprès de banques publiques de séquences telles que l'EBI (European Bioinformatics Institute), le NCBI (National Center for Biotechnology Information) et le DDBJ (DNA Data Bank of Japan). Les séquences ont été normalisées en enlevant des séquences redondantes à l'aide de site internet de service MAFFT. Ensuite le nom du gène cible et l'identité du genre et de l'espèce ont été gardés avant de les intégrer dans le pipeline d'analyses de bio-informatique. Cette base de données de séquences a servi à la fois pour la conception du couple d'amorces et pour la partie analytique consistant à aligner les séquences en sortie de séquençage pour les annoter.

III.2. Extraction d'ADN en pool à partir des nématodes Anisakidae

Les extractions d'ADN des échantillons destinés à l'identification en *HTS* ont été effectuées à l'Anses de Boulogne sur mer. Le choix technologique retenu consistant à séquençer de manière massale par *HTS*, l'exhaustivité des Anisakidae contaminant les échantillons considérés impose l'extraction en pool, en mélange d'Anisakidae. Pour atteindre cet objectif, l'extraction d'ADN en pool suivi par le séquençage *HTS* est une combinaison répondant aux exigences de faisabilité au niveau du coût et la complexité. Ici, chaque extraction représente un échantillon groupant un nombre de nématodes isolés d'une localisation corporelle de poisson. L'extraction d'ADN en pool va de pair avec la conception des amorces dégénérées, cette technique de séquençage permettant la détection d'au

moins quatre genres d'Anisakidae d'intérêt. Il s'agit d'extractions d'un grand nombre d'échantillons qui peut être chronophage. C Pour permettre une comparaison des diverses modalités d'extraction d'ADN une *qPCR* a été mise au point son objectif étant d'évaluer la présence d'éventuels inhibiteurs de *PCR*.

III.2.1. Mise au point de l'extraction d'ADN en pool et détermination de la quantité d'ADN / Optimisation des conditions de réalisation de la PCR de librairie

La sélection a été réalisée en deux phases en se basant sur la qualité et la quantité d'ADN obtenues. La première phase est la comparaison visant à préselectionner les kits satisfaisants les critères. La deuxième phase visait à évaluer la robustesse au niveau des résultats obtenus des kits préselectionnés durant la première phase. Pour la première phase, quatre méthodes d'extraction ont été testées et comparées :

- Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega) basée sur le principe de la précipitation des protéines
- Genomic DNA and total RNA purification NucleoBond® AXG Columns (Macherey-Nagel) basée sur l'échange d'anions sur une résine en fonction du pH et de la concentration en sels
- Genomic-Tip (Qiagen) basée sur le même principe que la précédente
- la méthode utilisant le phénol-chloroforme basée sur le principe de la séparation des phases (méthode utilisé en interne de l'ANSES).

Seules les durées d'incubation ont été modifiées par rapport aux conditions recommandées par les divers fournisseurs. Le choix des kits à comparer a été réalisé en considérant les 4 critères suivants : le rendement d'ADN, le prix, l'ergonomie et la sécurité du personnel. Chaque kit a été testé en utilisant des échantillons artificiels composés de la façon suivante : 100 mg de 75 % d'*Anisakis* (environ 43 à 47 individus), 3 % de *Contracaecum* (environ 1 individu), 2 % de *Pseudoterranova* (environ 1 individu) et 20 % d'*Hysterothylacium* (environ 1 individu). Ces proportions ont été définies à partir des proportions des différents genres précédemment observés dans les poissons de l'étude.

Les concentrations d'ADN ont été mesurées à l'aide du lecteur de microplaques à fluorescence (Tecan GENios, Tecan Genios, Switzerland) avec le Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen) et spectrophotomètre à 260 nm (un NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific, France)

La détermination de la pureté (observation la présence d'inhibiteurs), la quantité d'ADN et le nombre optimal de cycles pour une réalisation des phases de librairies ont été faits en *qPCR*. En métagénomique et métagénétique en *HTS*, le nombre de cycles doit être limité afin de quantifier pour cela, la fin du cycle de *PCR* ne doit pas se situer sur la phase d'initiation ou la phase stationnaire.

Les ADN issus des quatre méthodes ont été comparés en mesurant le Ct (*Cycle Threshold*) par *qPCR*. Le couple d'amorces F-univ-nem 5'-GGT GGT CTT TCT TTT GTT TCT G-3' et R-univ-nem 5'-ATA AAA CTA TGG TTA GCC CCA C-3' (530 pb) a été utilisé à cette fin. Le mélange réactionnel était le suivant : pour un volume final de 15 μL : 7,5 μL de Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green *QPCR* Master Mix (Stratagene, USA), 400 nM en concentration finale pour chaque amorce et 2 μL d'ADN. Les ADN obtenus par chaque méthode ont été normalisés à 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Cette solution à 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ a ensuite été diluée au demi en cascade (25 ; 12,5 ; 6,3 ; 3,1 ; 1,6 ; 0,8 et 0,4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) afin de déterminer la pureté des ADN issus de chaque méthode.

Le cycle d'amplification était le suivant : pré-dénaturation à 95 °C pendant 10 min, 45 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95 °C pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 45 °C pendant 15 sec et une étape d'élongation à 72 °C pendant 45 sec. La courbe de fusion s'effectuait de 47 °C à 95 °C en augmentant d'1 °C toutes les 5 sec (Corbette Rotor-Gene™6000, Qiagen, France).

Lors de la deuxième phase visant à évaluer la robustesse au niveau des résultats obtenus des kits présélectionnés durant la première phase, les deux meilleurs kits sélectionnés ont été utilisés sur 10 échantillons pour chaque méthode dans un premier temps afin d'évaluer la dispersion des résultats d'extraction obtenu et en suite les 10 extractions de chaque méthode ont été poolées. Ceci a permis d'évaluer la répétabilité de l'extraction de chaque méthode utilisée également. Les extractions d'ADN obtenues par chacune de ces deux méthodes évaluées ont été analysées par la méthode de *qPCR* décrite précédemment. Les deux extractions d'ADN poolées ont été diluées à 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ au départ et ensuite dilué au demi en cascade (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 et 0.3 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Ces tests ont également été effectués dans les mêmes conditions mais avec les amorces F-univ-nem *COX2* / R2-univ-nem *COX2* (440 pb) afin de définir le nombre de cycles pour la *PCR* de librairie de séquençage haut-débit.

A concentration égale, les ADNs issus du kit Macherey-Nagel Genomic DNA and total RNA purification NucleoBond AXG Columns ont obtenu les Ct les plus bas. Ayant donc introduit dans notre système de *qPCR* la même quantité après dosage d'ADN, ces différences de Ct ne peuvent se justifier que par la présence d'éléments influant sur l'efficacité de la *PCR*. Ce test *qPCR* a permis de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs et de sélectionner le kit permettant de s'en affranchir plus facilement. Le kit NucleoBond AXG Columns a donc été sélectionné pour réaliser les extractions d'ADN des échantillons collectés dans le cadre de l'étude.

III.2.2. Extraction d'ADN des échantillons de l'étude

Certains échantillons, nématodes issus d'une même localisation corporelle d'un poisson, ont présenté un grand nombre d'individus. En fonction des différents formats de colonnes d'extraction et

afin de ne pas saturer les colonnes avec trop de matériel de départ, ces échantillons ont été pesés et divisés pour réaliser différentes extractions. Concernant le kit sélectionné lors de l'étude comparative, 3 formats de colonnes de différentes capacités sont proposés par le fournisseur : AXG20, AXG100 et AXG500 qui permettent d'extraire l'ADN à partir d'un maximum de 20, 100 et 400 mg de matériel de départ, respectivement. Pour extraire l'ADN des nématodes en utilisant la colonne AXG20, 20 mg de nématodes ont été pesés et mis dans le tube BMTs (Sterile Bead meal tube) contenant 10 billes en inox de 0,6 mm de diamètre (Figure 34). Les nématodes ont été broyés à 6000 rpm, 3 x 2 min en utilisant l'appareil Ultra-Turrax Tube Drive. Dans le tube BMTs, 2 mL de tampon de lyse G2, 50 μL de protéinase K (20 mg.mL^{-1}) ont été ajoutés pour 20 mg de nématodes. Les tubes ont été ensuite incubés dans un bain-marie à 65 °C pendant 16 à 18 h cette étape visant à procéder à la lyse des parois cellulaires. Le lysat a été transféré dans un tube Falcon à centrifuger de 50 mL. La colonne a été équilibrée avec 1 mL de tampon N2 pour régénérer la colonne. Un millilitre de Buffer N2 à température ambiante a été ajouté dans le lysat pour stabiliser le pH du lysat. Le mélange a été vortexé à la vitesse maximum ($2500 \text{ tours.min}^{-1}$) pendant 15 sec puis transféré dans la colonne et mis à sédimenter par gravité, l'ADN se liant dans les résines. La colonne a été lavée avec 3 x 1 mL de tampon N3 puis l'ADN a été élué à l'aide de 1 mL de tampon N5. De l'isopropanol à 4 °C a été ajouté à l'échantillon (700 μL) pour l'élimination des protéines. L'ADN a précipité suite aux retournements successifs du tube qui est ensuite incubé pendant 30 min à température ambiante puis centrifugé pendant 10 min à $15\,000 \times g$ à 4 °C. Le surnageant a été éliminé en conservant le culot. Le séchage a été réalisé en deux étapes : par renversement du tube sur un papier puis renversement sur le portoir de façon à éliminer les solvants résiduels par une circulation d'air. L'ADN extrait a été remis en solution à l'aide de tampon Tris-EDTA (TE) pH 8 (1M Tris HCL et 0,1 M EDTA) préalablement chauffé à 65 °C. Le TE a été déposé sur l'ADN sans toucher la paroi du tube afin de prévenir tout risque de contamination.

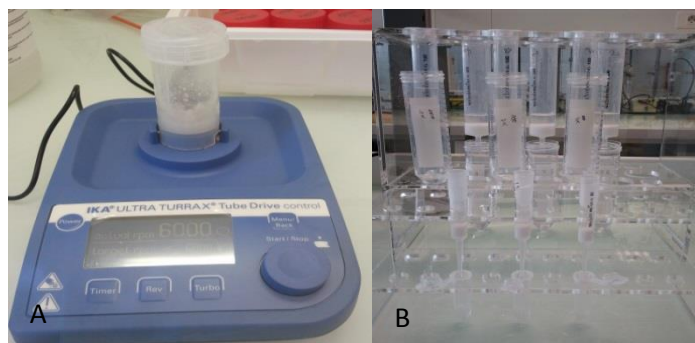


Figure 34 : Photographie d'un Ultra-Turrax Tube drive (A), et de l'extraction d'ADN en pool par le kit AXG NucleoBond (B).

La *qPCR* décrite ci-dessus a permis d'ajuster la quantité d'ADN extrait à amener pour réaliser la *PCR* de librairie de séquençage à haut-débit des Anisakidae. La quantité d'ADN choisie est comprise

entre 0, 60 ng et 20 ng, cette quantité permet de s'assurer que la *PCR* de librairie (en point final) est quantitative et ainsi de préserver l'information de la proportionnalité des divers éléments constitutifs de l'échantillon à l'issue de la phase de séquençage. En cas d'ADN en quantité trop élevée, des dilutions ont été réalisées pour obtenir une concentration maximale de 20 ng.µL⁻¹. Le nombre de cycles à appliquer lors de la *PCR* en point final pour l'*HTS* est fixé à 30 et 32 cycles pour les deux classements de quantité d'ADN de l'échantillon (voire III.4.3 Préparation de la librairie en *PCR* pour la librairie).

La quantification puis le séquençage par la méthode *HTS* a été réalisée sur le site de l'Institut Pasteur de Lille. La quantification de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen) et du lecteur de microplaques à fluorescence (Tecan GENios, Tecan Genios, Switzerland). La fluorescence de l'échantillon est proportionnelle à la quantité d'ADN et grâce à la gamme étalon d'ADN λ réalisée en parallèle, nous avons pu déterminer la quantité d'ADN présente dans chaque échantillon de nématodes.

III.3. Design d'un nouveau couple d'amorces compatible avec la méthode de séquençage à haut débit

L'utilisation de la technologie PGM™ Ion Torrent (Life Technologies) permet le séquençage d'amplicons de longueurs allant de quelques dizaines de bases à 550 pb maximum. Le design d'un nouveau couple d'amorces était donc obligatoire, car l'addition des index sur l'ancien couple d'amorces conduisait à l'obtention d'un amplicon trop long (630 pb). Souhaitant identifier quatre genres d'Anisakidae conjointement, il a été décidé de designer des amorces dégénérées conformément au code IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Pour ce faire, à partir des 445 séquences des 4 genres Anisakidae collectées précédemment auprès des différentes banques publiques de séquences du gène *COX2*, un alignement a été réalisé pour déterminer quelle étaient les loci conservés (et les loci variables) du gène *COX2* en utilisant l'algorithme d'alignement MUSCLE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC390337/>) du logiciel Unipro UGENE (32-bit version/v1.12.1/10 Juillet 2013). Parmi les couples d'amorces testés, le couple F-univ-nem *COX2* 5' - AGTAAGAAGATTGARTATCAGTTT GGTGAACTT -3' (33 b, 56 °C de Tm) et R2-univ-nem *COX2* 5'- TCAGAGCACTGACCATAAAARACA-3' (24 b, 54 °C de Tm) a été sélectionné (Figure 35). La taille de l'amplicon obtenue à l'aide de ce couple d'amorces serait proche de 440 pb (référence : NC_007934 *Anisakis simplex*). Une fois designées, la séquence des amorces a été alignée par BLAST afin de confirmer leur similarité avec les séquences des quatre genres étudiés. La qualité des amorces a ensuite été validée par Fast*PCR* qui permet de rendre un score de qualité, ce travail a été complété en utilisant le web-service Oligocalc (Version3.2607/15/2010) www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html.

Tableau XIII : Mélange réactionnel de la PCR en point final indexée

Réactifs	Volume (µL)
Eau	69,1
Tampon 10x	10
MgSO ₄ 50 nM	5
dNTPs 10 nM	2,5
F-univ-nem COX2 10 µM	3
R2-univ-nem COX2 10 µM	6
Taq High Fidelity 5 U.µL ⁻¹ (Lifetechnologies)	0,4
AND (0,6 ng.µL ⁻¹ à 20 ng.µL ⁻¹ maximum)	4
Total	100

Le cycle utilisé débute par une activation initiale pendant 2 min à 94 °C. Trente-cinq cycles d'amplification ont été réalisés selon le programme suivant : dénaturation pendant 15 sec à 94 °C, 25 sec d'hybridation à 44 °C et une élongation de 50 sec à 68 °C. La séparation électrophorétique des produits amplifiés a été effectuée sur gel d'agarose de 1,5 %. L'ajout de 3,5 ‰ de BET (V/V) dans le gel a permis la visualisation des produits amplifiés.

III.4.2. Indexation des amorces pour la PCR de librairie

Afin d'identifier les quatre genres d'Anisakidae provenant de 96 échantillons en un run de séquençage, des index ont été utilisés pour identifier chaque échantillon. En 5', les amorces ont été complétées par des séquences avec des index *Ionexpress barcoding* (Integrated DNA Technologies, Belgium) comprenant :

- Une clé : quatre bases nucléotides (A, C, T, G), servant à signaler ou calibrer le système au début du séquençage au niveau de chaque puits du séquençage. Le séquençage de ces quatre bases immédiatement en 3' de l'amorce utilisée pour le séquençage permet au système d'identifier les puits présentant des billes vivantes sur lesquelles la matrice est suffisamment représentée d'un point de vue quantitatif (Bille ISP avec les séquences monoclonales. Ceci se traduit par la couleur rouge sur le profil de la puce (heat map).
- Un code-barres : 96 combinaisons différentes de 10 bases nucléotidiques. Celui-ci sert à réaliser le lien entre séquences produites et échantillon (quel poisson pour quel organe)
- Un Adaptateur A : 26 bases nucléotidiques. Il s'agit du site d'amorce universelle servant à débiter le séquençage à haut-débit.
- Un Adaptateur Trp1 : amorce de 23 bases nucléotidiques. Il sert à reconnaître l'amorce complémentaire sur la surface de bille ISP (Ionosphere particle) dans l'étape d'amplification clonale en PCR en émulsion.

Le fragment total amplifié était de 503 pb avec les index. La *PCR* de librairie a été réalisée en séparant en deux plaques : forward et reverse permettant de compenser le modèle d'erreur de la technologie employée (les erreurs ont une occurrence plus élevée pour des positions de nucléotide élevée). Chaque librairie a été ajustée et un mélange équimolaire de toutes les librairies a été réalisé

Pour obtenir les produits de *PCR* indexés forward, l'amorce forward a été synthétisée additionnée de la clé, du code-barres et de l'adaptateur A. Dans ce cas, l'amorce reverse a été additionnée de l'adaptateur Trp1.

Au contraire pour produire les produits *PCR* indexés Reverse, l'amorce reverse a été synthétisée additionnée de la clé, du code-barres et de l'adaptateur A, l'amorce forward étant additionnée de l'adaptateur Trp1.

La Figure 36 résume le principe de la *PCR* de librairies indexées de 96 échantillons (nématodes provenant des 96 localisations corporelles de plusieurs poissons). A partir du 3^{ème} cycle de la *PCR*, l'amplicon souhaité apparaissait dans les plaques *PCR forward* et *reverse* jusqu'à la fin de la *PCR*, il comprenait tous les éléments de l'index décrits précédemment.

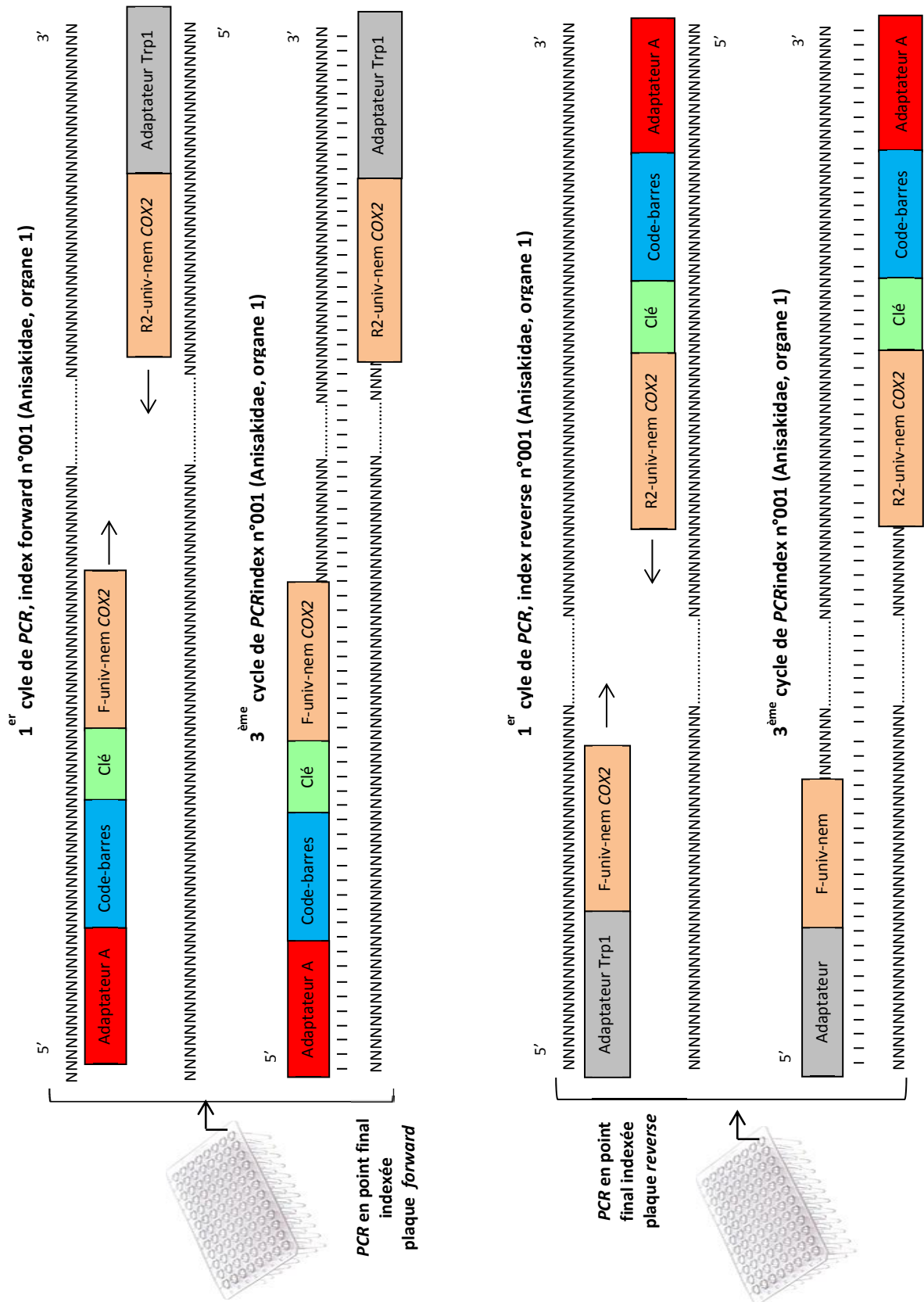


Figure 36 : Principe de la PCR en point final indexée

Les 96 échantillons ont été amplifiés par PCR en point final indexée à la fois en PCR forward et en PCR reverse. A partir du 3^{ème} cycle de la PCR, les amplicons possédaient l'adaptateur A, le code-barres, la clé, l'amorce et l'adaptateur Trp1

III.4.3. *Préparation de la librairie en PCR pour la librairie*

Tableau XIV : Mélange réactionnel pour la PCR Forward

PCR Forward	100 puits (pour 1 plaque de 96 puits)	Unité
H ₂ O ultra pure	6910	μL
Buffer 10X	1000	μL
MgSO ₄ 50 mM	500	μL
dNTPs 10 mM	250	μL
Taq High Fidelity 5U.μL ⁻¹ (Lifetechnologies)	40	μL
Reverse+Trp1 10 μM	600	μL
Total Mix	9300	μL
Forward+index 10μM	3	μL/puits
ADN	4	μL
Volume mix à distribuer	93	μL/puits

Tableau XV : Mélange réactionnel pour la PCR Reverse

PCR Reverse	100 puits (pour 1 plaque de 96 puits)	Unité
H ₂ O ultra pure	6910	μL
Buffer 10X	1000	μL
MgSO ₄ 50 mM	500	μL
dNTPs 10 mM	250	μL
Taq High Fidelity 5U.μL ⁻¹ (Lifetechnologies)	40	μL
Forward+Trp1 10 μM	300	μL
Total Mix	9000	μL
Reverse+index 10μM	6	μL/puits
ADN	4	μL
Volume mix à distribuer	90	μL/puits

Pour la PCR indexée, le mélange réactionnel (Tableau XIV et Tableau XV) a été préparé sans l'amorce qui contenait la clé, le code-barres et l'adaptateur A. Ce mélange réactionnel a été distribué dans la plaque de 96 puits : soit 93 μL pour le *Forward*, soit 90 μL pour le *Reverse*. Ensuite, l'amorce qui contenait la clé, le code-barres et l'adaptateur A a été ajoutée : soit 3 μL pour l'amorce *Forward* (0,3 μM), soit 6 μL pour l'amorce *Reverse* (0,6 μM) à l'aide d'une pipette multicanaux. Les ADN des échantillons ont été distribués au préalable dans chaque puits de la plaque de PCR un par un et ont ensuite été congelés. Ils ont été décongelés et centrifugés avant d'ajouter les mélanges réactionnels. Les 32 cycles de PCR ont été appliqués pour les runs 1, 2 et 3 de HTS dans lesquels les concentrations en ADN des échantillons étaient de 0,6 à 9,30 ng.μL⁻¹. Le but était accroître le facteur d'amplification des nématodes dont les ADN étaient présents en faible quantité. Les 30 cycles ont été appliqués pour les runs 4, 5 et 6 dans lesquels les concentrations en ADN des échantillons étaient de 9,30 à 20 ng.μL⁻¹. Tous les échantillons qui contenaient plus de 20 ng.μL⁻¹ d'ADN ont été dilués à 20 ng.μL⁻¹.

Les produits de PCR ont été purifiés en utilisant le kit de purification par filtre en plaque (NucleoFast®96 Ultrafiltration membrane). La quantification a été réalisée en utilisant le lecteur de microplaques à fluorescence et le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Tecan Genios, Switzerland).

III.5. Le mélange équimolaire

Après avoir purifié et quantifié les produits *PCR* des plaques forward et reverse, les deux ont ensuite été mélangés en quantité équimolaire. La concentration d'ADN a été normalisée de façon à obtenir un mélange équimolaire. La proportion des nématodes de chaque échantillon reste proportionnelle : théoriquement à l'issue du séquençage, une librairie indexée constituée de 96 codes barres permettra d'obtenir les séquences représentatives d'un échantillon à hauteur d'environ 1 % du total des séquences produites. Le mélange a permis d'équilibrer le matériel en entrant appelé le « input ». A partir de cette étape, la librairie a été obtenue. La librairie a été ensuite purifiée par bille magnétique carboylé pouvant se lier avec les ADN (Magbio, Moka science, France), et a été sélectionnée à la taille attendue sur gel d'agarose (3 kb maximum, E-gel®Size select™ Agarose gel, Invitrogen™, France) (Figure 37).

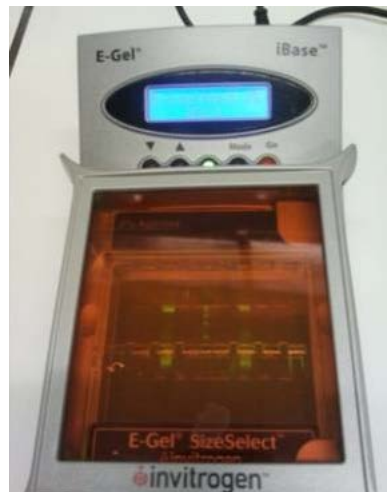


Figure 37 : Appareil E-gel sizeSelect contenant le e-gel pour effectuer la sélection des produits *PCR* sur la base de leur taille

III.6. Amplification clonale par *PCR* en émulsion

La *PCR* en émulsion a été utilisée pour cloner la librairie et obtenir des séquences monoclonales d'un même type de nématodes sur une bille de support appelée bille ISP (Ion sphere particle). Ces billes ont été utilisées comme support pour le *HTS*.

La Figure 39 illustre la réaction de la *PCR* en émulsion. L'amorce présente à la surface des billes ISP est complémentaire de l'adaptateur Trp1 de la matrice de librairie. Pendant la dénaturation, un brin se fixait sur l'amorce de la bille dans un micro-environnement hydrophile appelé « microréacteur », les billes des divers microréacteurs sont isolées par de l'huile. Une bille contenant 10 millions d'amorces, le même nombre de séquences monoclonales peut être potentiellement obtenu. L'amplification sur les billes ISP, aussi appelées « billes vivantes », peut engendrer deux cas de figure : une amplification monoclonale ou polyclonale. Dans le cas contraire, elles étaient qualifiées de « billes mortes » aucune séquence de librairie n'était présente dans le microréacteur

donné. Le ratio quantité de billes / nombre de copies d'ADN permet de favoriser la probabilité d'obtention d'amplification monoclonale. Vingt-cinq microlitres de la librairie de 26 pmol dans 100 μ L de billes permet d'obtenir un brin d'ADN pour un type de parasite sur une bille. Au final, une bille contient jusqu'à 10 millions de brins d'ADN. Cette réaction a été réalisée avec le kit *PCR* Ion PGM Template OT2 400 sur la plateforme Ion OneTouch™ 2 (Figure 38).

L'étape d'enrichissement utilisant l'automate Ion OneTouch™ a permis de cribler les produits clonaux, en sélectionnant spécifiquement les « billes vivantes ».

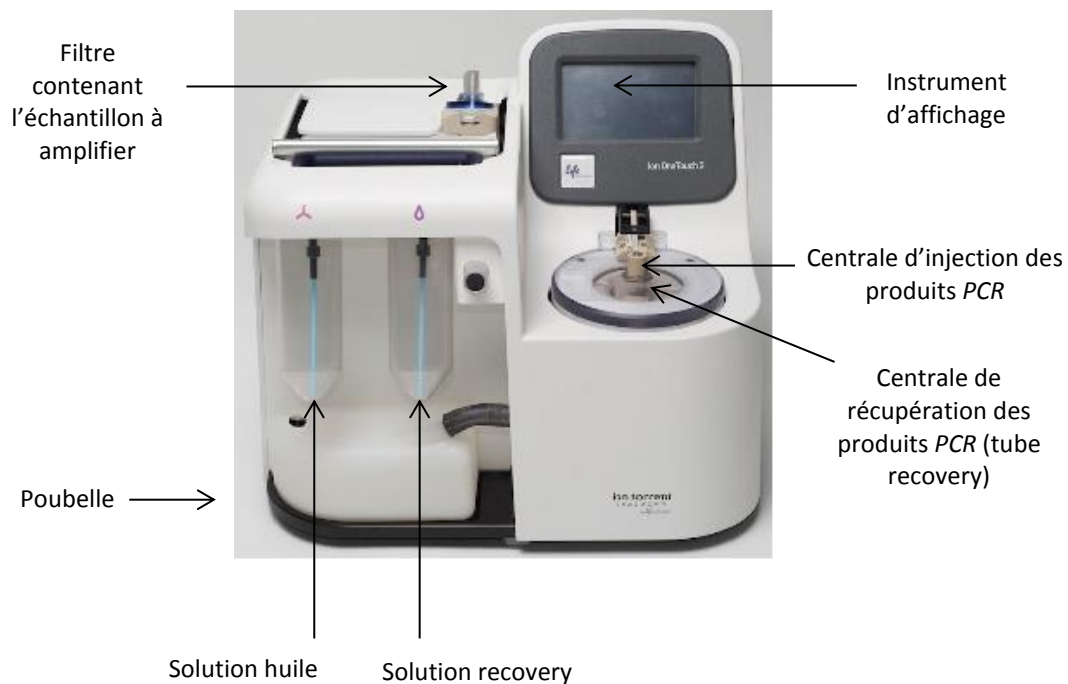


Figure 38 : Plateforme Ion OneTouch™2 utilisée pour la PCR en émulsion nécessaire à la phase d'amplification clonale.

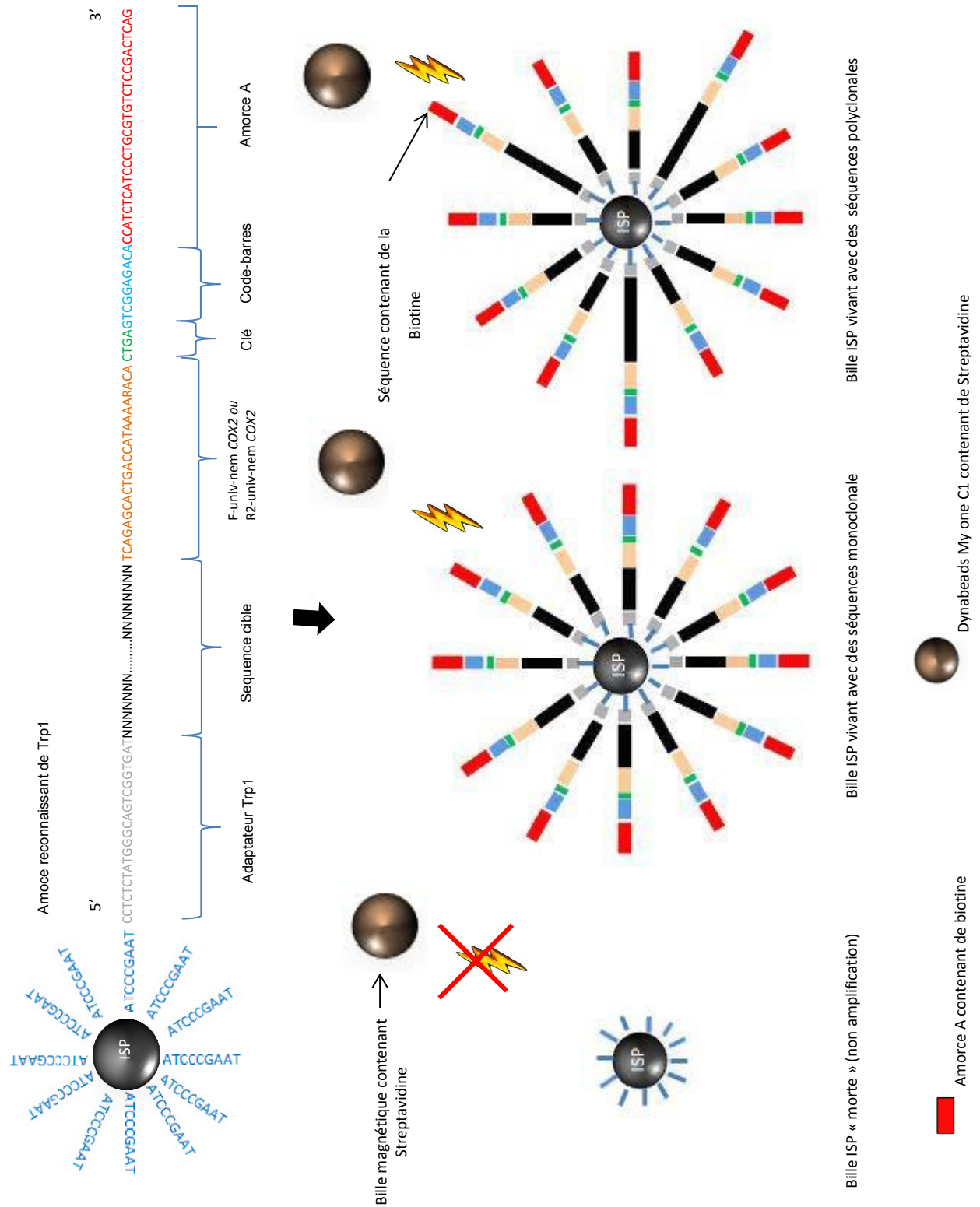


Figure 39 : Schéma de la PCR en émulsion

: Une bille ISP pendant la phase d'amplification clonale en PCR émulsion, Représentation schématique d'une bille ISP contenant des amorces reconnues par un brin d'ADN contenant l'Adaptateur Trp1. Enrichissement après la PCR en émulsion pour la sélection des billes ISPs vivantes en utilisant des billes de streptavidine qui se lie à la biotine présente sur l'amorce A (rouge).

La Figure 39 illustre le principe de l'automate. La sélection spécifique des « billes vivantes » est assurée par une reconnaissance streptavidine/biotine. Des billes magnétiques *Dynabeads my One Streptavidine C1* ont été ajoutées et celle-ci se lient spécifiquement à la biotine présente sur l'amorce A des amplicons à la surface des billes IPS et absente des « billes mortes ».

La PCR en émulsion et l'enrichissement des billes ISP comprend différentes étapes.

- Préparation du mélange réactionnel de la PCR en émulsion :

La librairie a été diluée de façon à amener la quantité d'ADN à 26 pmol.L⁻¹ afin d'obtenir 10 millions de brin d'ADN d'un même type de parasite par bille, puis le mélange réactionnel (Tableau XVI) a été réalisé.

Tableau XVI : Mélange réactionnel pour la PCR en émulsion en phase d'amplification clonale.

Réactifs et matrice	Volume (µL)	Vortex (sec)	Microcentrifugé (quelques min)	conservation
OT2 400 Reagent mix	500	30	oui	température ambiante
OT2 400 PCR Reagent B	285	60	oui	température ambiante
OT2 400 Enzyme mix	50	non	oui	sur glace
OT2 400 Reagent X	40	non	oui	sur glace
Matrice ISP positives (librairie)	25	5	oui	sur glace
Total	900			

Le mélange a été vortexé 5 sec et centrifugé pendant 5 sec, puis 100 µL de billes ISP bien homogénéisées ont ensuite été ajoutés au mélange. L'ensemble a été homogénéisé par des pipetages répétés. Le mélange homogénéisé puis centrifugé 5 sec a été déposé dans le pore d'un filtre de PCR (Figure 40). Mille cinq cent microlitres de « reaction oil » ont été ajoutés sur le même pore puis le filtre a été transféré sur la plateforme Ion OneTouch™2 réalisant par la suite la réaction de PCR durant 6 h.



Figure 40 : Filtre réceptionnant le mélange réactionnel de la PCR en émulsion.

- Récupération des billes ISP

A l'issue de la PCR, les produits ont été récupérés dans les tubes *Recovery* par centrifugation. Le surnageant a été éliminé de chaque tube en laissant 100 µL dans chaque tube (Figure 41 A) sans perturber le culot contenant les billes ISP. Les 100 µL de solution *recovery* restant ont été mélangés puis transférés dans un tube Eppendorf *Lowbind*, évitant l'adsorption de matrice sur les parois. La

même procédure a été réalisée pour le second tube recovery transféré dans le même tube *Lowbind*. Ensuite, 2 x 500 μ L d'*Ion one Touch Wash Solution* ont été utilisés pour récupérer un maximum de billes ISP résiduelles dans les tubes recovery, le tout étant transféré dans le même tube *Lowbind*. Le tube a été incubé dans un bain à sec à 50 °C pendant 2 min et centrifugé à 15 500 g, le surnageant a été éliminé avec précaution en laissant 100 μ L de volume en plus du culot (Figure 41 B) ceci constituant la « matrice ISP (librairie) ».

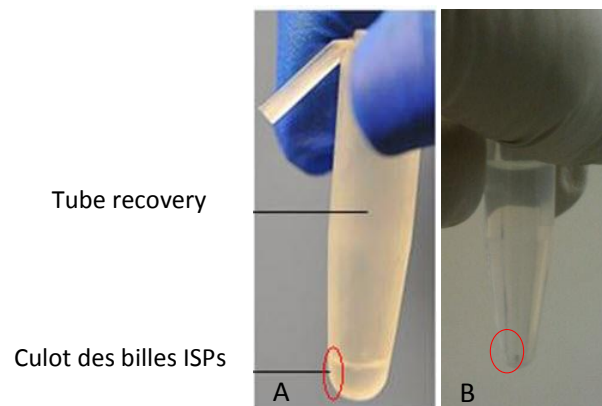


Figure 41 : Image du tube *recovery* contenant les produits de PCR en émulsion

- Enrichissement des billes ISP

Pour sélectionner les « billes vivantes » une solution « Melt-off » composée de 280 μ L de solution Tween et 40 μ L de NaOH 1M a été préparée. Puis, un flacon de billes *Dynabeads My One Streptavidin C1* a été vortexé à vitesse maximale pendant 30 sec, 13 μ L ont été prélevés dans un tube Eppendorf *Lowbind*. Le tube a été placé sur une barrette magnétique pendant 2 min, l'excès de liquide a été éliminé, puis le tube a été retiré de la barrette. Un lavage des billes magnétiques avec 130 μ L de *MyOne Beads Wash* a été réalisé à l'aide d'un vortex à vitesse maximum pendant 1 min. Parallèlement un microtube de 0,2 mL contenant 10 μ L de solution *Neutralization* a été placé sur l'automate afin de récupérer la solution de billes ISP en fin de procédure. Les trois produits précédents ont été placés sur une barrette d'enrichissement contenant 8 puits (P1 – P8) : P1 - 100 μ L de la matrice ISP ; P2 - 130 μ L de *Dynabeads My One Streptavidin C1* ; P3 à P5 - 3 x 300 μ L de solution de lavage; P6 - puits laissé vide ; P7 - 300 μ L de la solution Melt-Off et P8 laissé vide. L'automate est activé pour une procédure d'environ 35 min. A l'issue de ce temps, le micro-tube de 0,2 mL contenant les billes ISP vivantes récupérées aussi appelée « matrice ISP positives », celles-ci sont homogénéisées par retournement (un minimum de 10 fois) et conservées sur glace.

III.7. Le séquençage à haut débit (PGM™ Ion Torrent plateforme)

Cette plateforme est un séquenceur de faible encombrement (Figure 42) qui fonctionne avec trois types de puce de séquençage selon débit de séquences nécessaires au projet à réaliser: Ion

314™v2 Chip: 1 million de puits/ 30-100 Mb, Ion 316™v2 Chip: 6 millions de puits/ 300 Mb – 1.0 Gb, Ion 318™v2 Chip: 11 millions de puits/ 600 Mb -2.0 Gb.



Figure 42 : plateforme PGM™ Ion Torrent

Le séquençage à haut- débit fait intervenir plusieurs étapes :

III.7.1. Initialisation du système

Le kit de séquençage Ion PGM™ Sequencing 400 est utilisé. Une étape préalable de lavage était nécessaire afin d'éviter une contamination provenant d'un *run* précédent. Le pH du système était calibré à 7,8 ce qui sert de valeur de base entre les différentes étapes de wash and scan. La solution de calibration, ou bouteille W2, était composée de 200 mL d'eau (18 MΩ), d'une bouteille de solution Ion PGM™ Sequencing 400 W2 et de 110 µL de NaOH 100 mM. La bouteille W2 a bien été homogénéisée par retournements successifs. La bouteille W1 a été remplie avec 350 µL de NaOH 100 mM. La bouteille W3 était composée de 50 mL de solution PGM™ Sequencing 400 1X W3 Solution. Les trois bouteilles ont été positionnées sur le séquenceur à leur emplacement prévu.

Pendant ce temps, les dNTPs ont été préparés séparément dans un tube à centrifuger de 50 mL. Vingt microlitres de dNTPs ont été déposés dans chaque tube, puis ceux-ci ont été positionnés à un emplacement prédéfini sur le séquenceur.

III.7.2. Préparation du chargement de la puce de séquençage

Selon la capacité de la puce choisie 314™v2 Chip ou 318™v2 Chip des volumes respectifs de 115 µL ou 230 µL de matrice *ISP* positive sont utilisés.

Concernant la puce 318™v2 Chip, après avoir vortexé, puis centrifugé la matrice *ISP* positive pendant 2 sec, 5 µL de *Control Ion Sphere™ Particles* ont été ajoutés. L'ensemble a été homogénéisé par pipetage, puis le mélange a été centrifugé pendant 2 min à 15 500 g. Le surnageant a été éliminé et 15 µL de liquide ont été conservés ainsi que le culot. Douze microlitres de *Sequencing Primer* ont été ajoutés et le tout a été homogénéisé par pipetage. Le tube a ensuite été placé dans le

thermocycler pour initier la fixation des amorces sur les amplicons de la matrice à 95 °C x 2 min et 37 °C x 2 min avec option *headlid*. Le produit final a été conservé à température ambiante.

III.7.3. Vérification de la puce « Chip check »

Après l'initialisation du système, les tubes de dNTPs ont été remplis de la solution provenant de la bouteille W2. Le pH a été fixé à 7,8 puis la conformité de la puce a été vérifiée par la plateforme. L'imagerie de puce est montrée l'état initial de la puce appelé « *heatmap* ».

III.7.4. Ajout de la Taq polymérase à la matrice ISPs positive

À l'issue de l'initiation de la fixation des amorces (III.7.2), 3 µL d'Ion PGM™ Sequencing 400 Polymerase ont été ajoutés dans la matrice de séquençage, le tout atteignant un volume final de 30 µL. Avant d'effectuer le chargement de la puce, la matrice a été mélangée par pipetage aller-retours et incubée à température ambiante pendant 5 min.

III.7.5. Chargement de la puce

- Avant le chargement, le liquide d'initialisation a été enlevé de la puce. À cette étape, le travail est fait en évitant tout apport d'électricité statique (l'utilisation de gants est donc proscrite). La puce Ion 318™v2 Chip est tenue de façon à l'incliner à 45° (Figure 43 A), et le mélange réactionnel a été déposé dans la cupule réservée à cet effet. La puce a été placée sur la centrifugeuse Ion PGM™ Weighted Chip Bucket en renversant la puce dont le pore est à l'intérieur de la centrifugeuse (*Pointing in*) comme représenté sur la Figure 43 B et centrifugé pendant 5 sec. L'excédent de liquide est enfin enlevé de la puce.

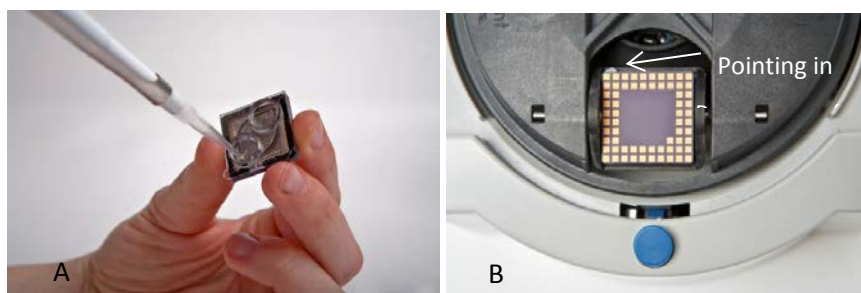


Figure 43 : Elimination du liquide de la puce (A), centrifugation de la puce (B)

- La matrice ISPs positive (bibliothèque) polymérisée a été chargée sur la puce posée sur le support de la centrifugeuse. Le chargement de la matrice a été effectué en tournant lentement la manette de pipette (environ 1 µL / sec) en laissant environ 0.5 µL de la matrice non injectée afin d'éviter la présence de bulles d'air (Figure 44).

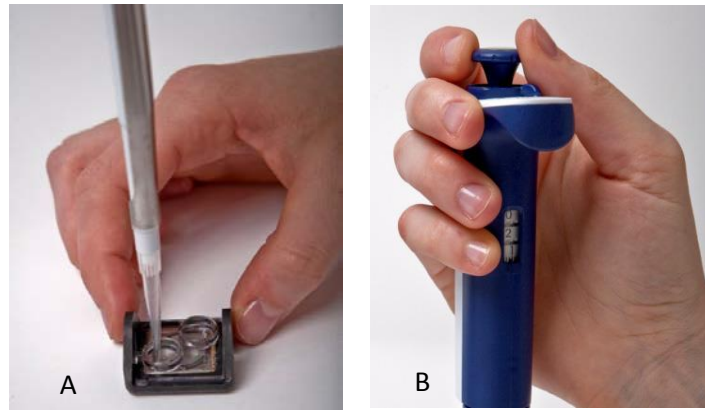


Figure 44 : Chargement de la matrice ISP positive sur la puce (A), en tournant la pipette (B).

- La puce a été transférée sur la centrifugeuse. Pour commencer, la puce a été centrifugée pendant 30 sec en position « *Pointing in* » non renversée (Figure 45).

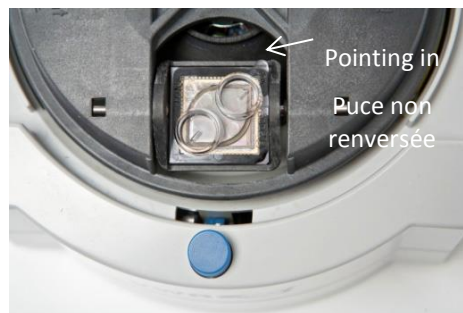


Figure 45 : Position "pointing in" pour la centrifugation de la puce de séquençage.

- La puce a été enlevée de la centrifugeuse. La puce a été inclinée à 45 °. La matrice constituée d'ISP positive dans la puce a été mélangée en pipétant à 25 μ L et refoulant dans la puce lentement. Le mouvement a été répété 3 fois. La puce a été remise dans le support de la centrifugeuse mais cette fois-ci avec la position « *Pointing out* ». Cette étape a été effectuée 3 fois.
- La dernière étape consiste à mélanger 5 fois avant d'effectuer la centrifugation avec « *pointing in* ».
- le liquide a été enlevé complètement de la puce. S'il reste encore du liquide, la centrifugation pendant 5 sec en position « *pointing out* » avec la puce non renversée a permis d'enlever le liquide restant.
- La puce a été déposée sur le compartiment du séquenceur (Figure 46). Le paramétrage du run de séquençage (nom du run, type de séquençage, nom des codes-barres, type de flux) est renseigné. Dans le cas d'un protocole 400 pb, le run de séquençage dure 4 heures.



Figure 46 : Insertion de la puce après avoir injecté la matrice de séquençage.

III.7.6. Contrôle qualité des séquences issues du séquençage

Suite au séquençage, un contrôle qualité du séquençage est mené à l'aide de l'outil FastQC. Le démultiplexage permettant à partir d'un fichier FASTQ de récupérer un fichier FASTQ où chaque fichier correspond à un index (ceci est réalisé par la suite logicielle de Ion Torrent) afin de réaliser le BLAST local sur le *pipeline* d'analyse bioinformatique sur Galaxy (Figure 49). Le format FASTQ est un format de fichier texte permettant de stocker à la fois des séquences biologiques (uniquement des séquences nucléiques) et les scores de qualité associés (Figure 47).

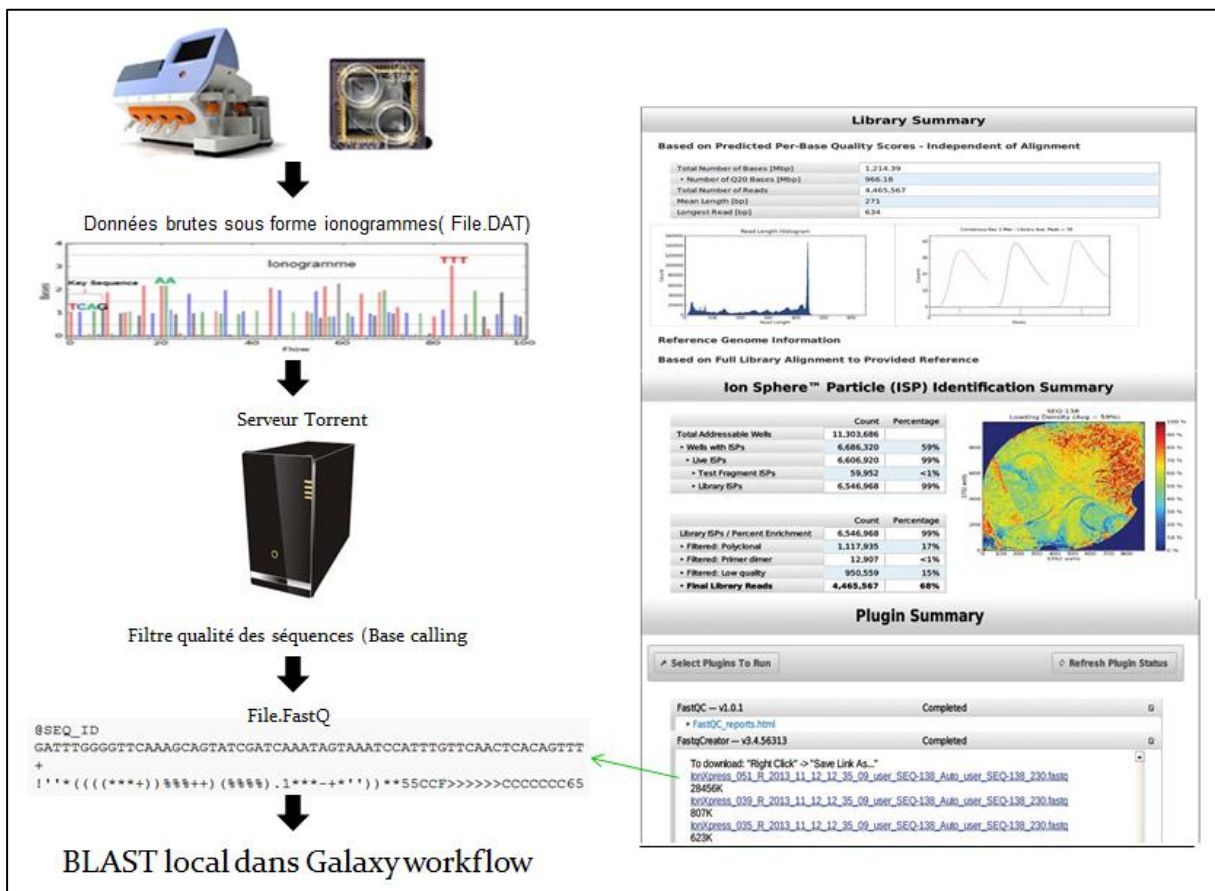


Figure 47 : Contrôle qualité des séquences issues du séquençage par le serveur Torrent qui donne le format de séquence final en FASTQ.

III.8. Elaboration du pipeline d'analyse pour le traitement des séquences issues du séquençage haut débit

Le pipeline d'analyse est appelé « Nonnoy ». Le mot « *Nonnoy* » est issu de la langue thaïe. « *Non* » signifie ver et « *noy* » signifie petit. *Nonnoy* peut donc se traduire par « petit ver ». Ce *pipeline* bio-informatique permet le traitement des informations biologiques générées par le séquençage d'un fragment de gène des nématodes. Cet outil a permis de filtrer et/ou sélectionner des séquences de qualité souhaitée avant d'effectuer un *BLASTn* sur une banque de séquences locale. Cette base de données de séquences est issue des séquences alignées lors de la phase de conception des amorces. Le pipeline développé est interfacé par Galaxy déployé sur une instance locale, la base de données de séquences étant elle-même accessible sur cette même instance.

Le *pipeline Nonnoy* est composé de plusieurs étapes constitutives du *pipeline*, certaines sont illustrées dans la Figure 48.

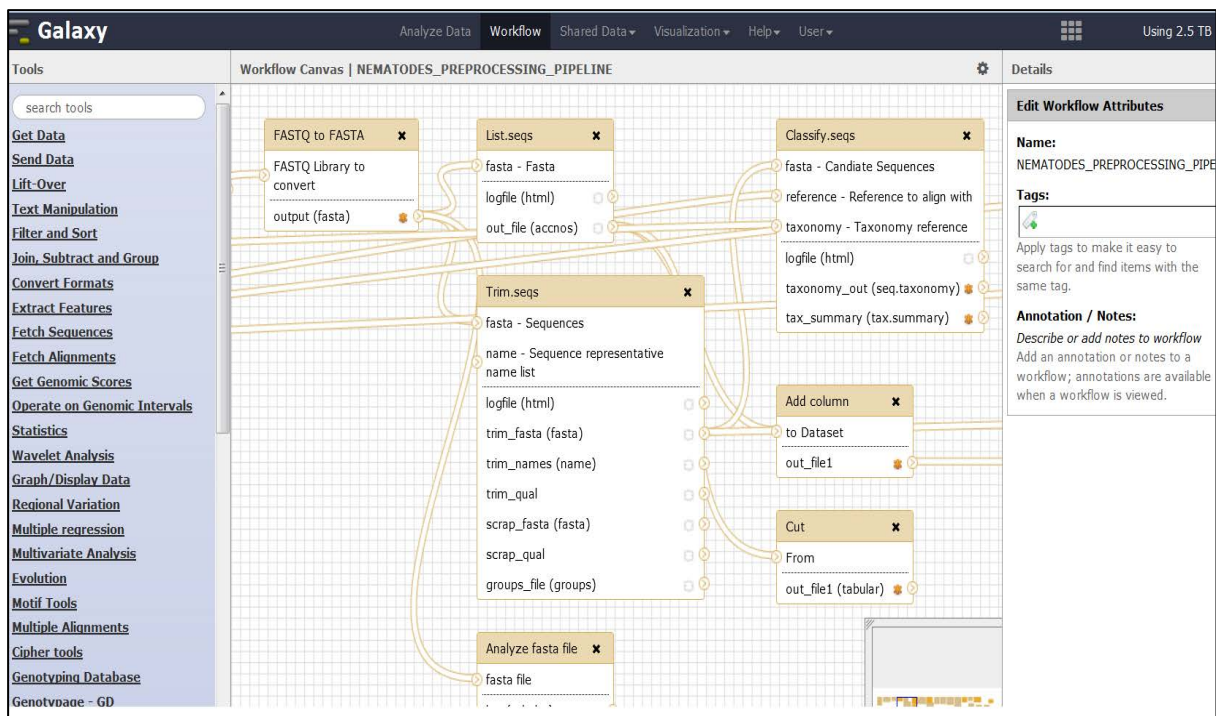


Figure 48 : Le *pipeline* d'analyse "*Nonnoy*" tel qu'il peut être représenté au sein du moteur de workflows Galaxy.

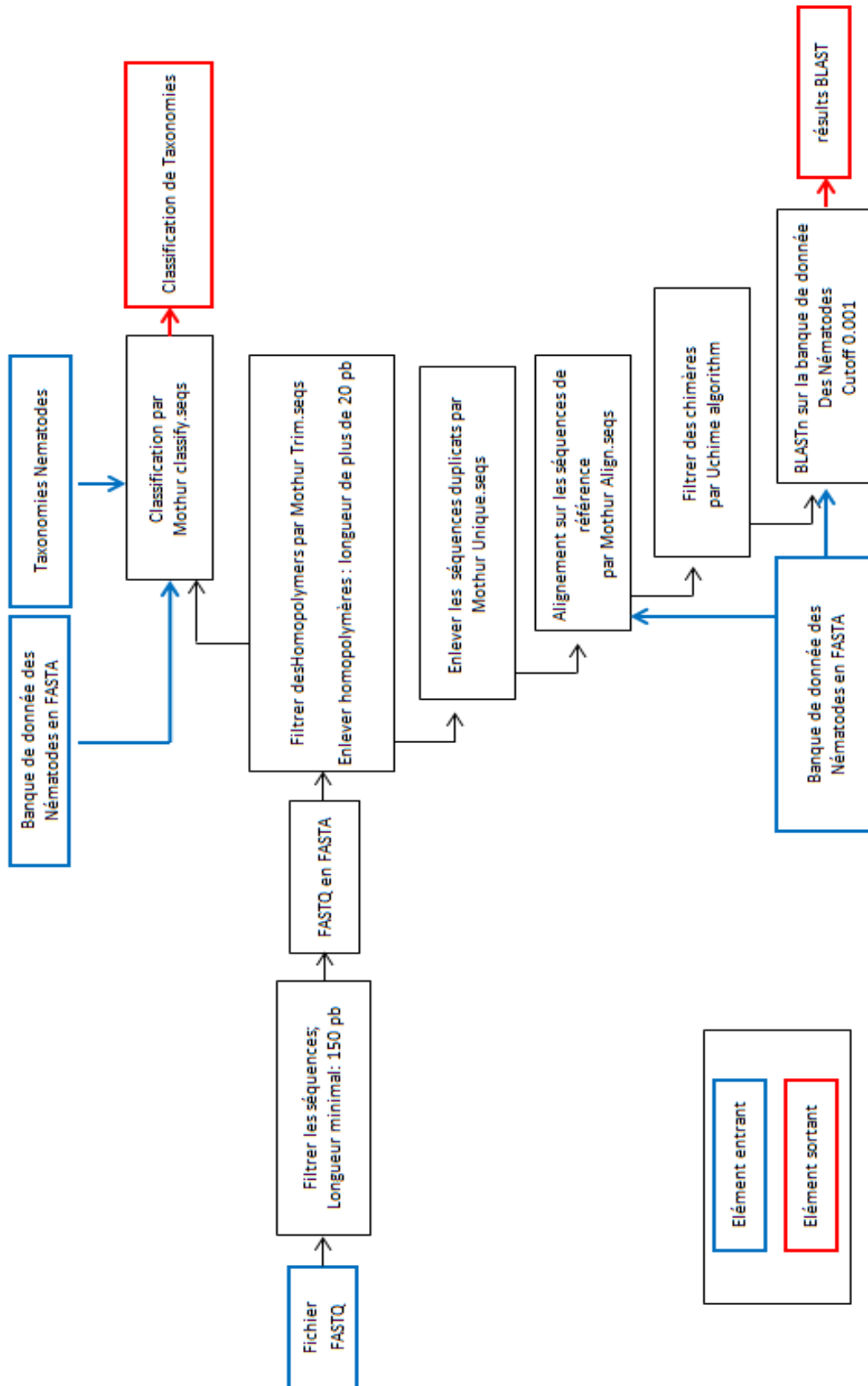


Figure 49 : Enchaînement des workflows du Pipeline d'analyse "Nonnoy"

La Figure 49 montre le principe général du *pipeline Nonnoy*. Le *pipeline* étant plus complexe que la version simplifiée présentée en Figure 48, il est nécessaire d'effectuer plusieurs étapes avant de pouvoir accomplir le *BLASTn* final :

- Tout d'abord, les résultats, sous forme de FASTQ ont été téléchargés du serveur lié au séquenceur. La taxonomie et la base de données de séquences de référence ont été importées dans le *pipeline* d'analyse *Nonnoy*. Un filtre a permis de supprimer les *reads* dont la taille est inférieure à 150 pb.
- Les séquences FASTQ ayant passé ce premier filtre ont été transformées sous format FASTA.
- Les séquences du fichier FASTA ont ensuite été passées par une étape de filtrage des homopolymères, des indexes à l'aide de l'outil de *Mothur.Trim.seqs*. Les *reads* contenant des homopolymères de plus de 20 pb ont été supprimés.
- Les duplicats (*reads* de taille et séquences strictement identiques) de séquences ont été supprimés à l'aide du même outil.
- Les séquences ont ensuite été alignées toujours à l'aide de *Mothur Align.seqs* avec les séquences de la base de données afin de permettre un filtrage des chimères (*artefact* de séquences représentant des organismes inexistant).

Les séquences filtrées par les étapes précédemment décrites ont permis une attribution taxonomique consistant à placer une étiquette taxonomique transférée de la base de données de séquences à la séquence (*query* : un *read*) de grande homologie ayant été alignée dessus et, en parallèle, un *BLAST* local

- L'attribution des séquences à leur taxonomie a été réalisée contre la base de données de séquence à l'aide de l'outil *Mothur Classify.seqs*. Cet outil dispose des différentes méthodes d'alignement à utiliser.
- Les séquences ont été blastées contre la banque de références et les meilleurs scores pour chaque séquence ont été regroupés dans une table de comptage en utilisant le plus petit ancêtre commun.

A la fin de l'analyse, le *pipeline* propose un tableau de comptage où chaque espèce identifiée est associée au nombre de séquences ayant renvoyé le même résultat de *BLAST*. Chaque index est représenté sous forme d'une historique schématisé Figure 50.

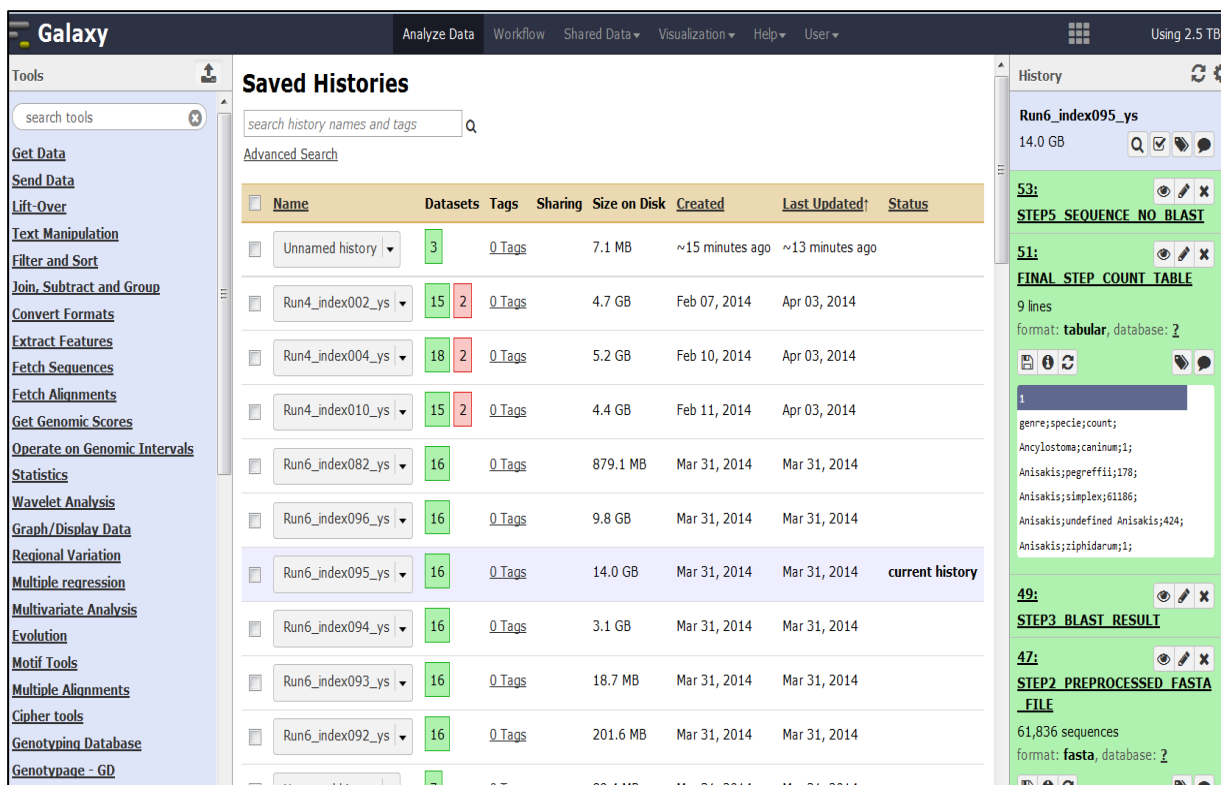


Figure 50 : impression d'écran de l'Interface Galaxy

La colonne à gauche contient les différents outils bioinformatiques disponibles, la partie centrale de la page correspond à l'historique du travail en cours, la colonne à droite recense l'état d'avancement des analyses en cours.

III.9. Expérience pilote de séquençage et *Benchmark*

Ce test pilote a été effectué dans le but de tester l'efficacité de l'ensemble des outils développés avant l'application sur les échantillons à identifier. Le *Benchmark* est une simulation des conditions réelles des échantillons à étudier, il permet de maîtriser complètement ce qui entre dans le système et de comparer les résultats obtenus en fin d'analyse aux échantillons introduits.

Un pilote a été testé. Le pilote a pour but de séquencer un échantillon connu et d'effectuer le BLASTn local sur la grande banque de gènes prévu pour l'étude des échantillons de *Fish-Parasites*.

III.9.1. *Echantillon de pilote*

L'échantillon provenait de l'extraction d'ADN groupée de 10 individus par genre. Le genre de parasite a été déterminé par l'identification morphologique à l'aide d'un microscope. L'extraction d'ADN a été faite en utilisant le kit *Wizard® Genomic DNA purification* (Promega, France). Les quantités d'ADN ont été mesurées à l'aide du lecteur de microplaques à fluorescence (Tecan GENios, Tecan Genios, Switzerland) avec le Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit et d'un spectrophotometer à 260 nm (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific, France). Les ADN de chaque genre obtenu ont été dilués à la quantité la plus proche possible (Tableau XVII).

Tableau XVII : Quantité d'ADN des 4 genres d'Anisakidae utilisée en *Benchmark* pour le premier pilote de séquençage HTS.

Nom de parasite	[Finale]ng.µl ⁻¹
<i>Anisakis</i>	9,18
<i>Contracaecum</i>	9,5
<i>Pseudoterranova</i>	10,36
<i>Hysterothylacium</i>	9,5

III.9.2. Préparation du Benchmark

Les mélanges ont été créés à partir de l'ADN obtenus précédemment. Les 5 index *forward* et *reverse* ont été utilisés.

Tableau XVIII : Benchmark de pilotes de séquençage HTS.

	Index001	Index002	Index003	Index004	Index005
Nom de parasite	Mélange A (µl)	Mélange B (µl)	Mélange C (µl)	Mélange D (µl)	Mélange E (µl)
<i>Anisakis</i>	25	75	2		0
<i>Contracaecum</i>	25	3	20	Extraction d'ADN en mélange en utilisant les proportions du pool B (poids total = 100 mg)	50
<i>Pseudoterranova</i>	25	2	75		50
<i>Hysterothylacium</i>	25	20	3		0
Pour	100	100	100		100

Le Tableau XVIII représente les différents mélanges d'ADN des quatre genres d'Anisakidae en différentes proportions. L'index 002 était une condition proche des quantités de nématodes trouvées dans une localisation corporelle de poisson. L'index 004 était différent des autres car il a été extrait réellement à partir du mélange des quatre genres d'Anisakidae. La quantité d'Anisakidae mis dans ce mélange était de 7 *Anisakis*, un *Contracaecum*, un *Pseudoterranova* et un *Hysterothylacium*. A cause de la différence de taille des parasites, il a été difficile de le mélanger exactement au même pourcentage dans la condition de l'index002.

Le séquençage a été fait en suivant la Figure 51.

III.9.3. Séquençage à haut débit de l'étude pilote

La Figure 51 résume les différentes étapes pour le HTS. La quantité d'ADN était comprise entre 0,60 ng et 20 ng. Ensuite la PCR en point final indexée en utilisant des amorces indexées de l'index 001 à 005 en PCR *forward* et de *reverse* a été effectuée. Les produits PCR ont été purifiés en utilisant le kit NucleoFast®96(Ultrafiltration membrane, Germany).

Les produits PCR ont été quantifiés par le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit sur le lecteur de microplaques à fluorescence (Tecan GENios, Tecan Genios, Switzerland). Les produits PCR des 5 index de *forward* et *reverse* ont été ensuite mélangés en même quantité d'ADN pour établir le mélange équimolaire.

La librairie a été ensuite purifiée sur les billes magnétiques (Magbio, Mokca science, France) et la librairie a été sélectionnée à la taille attendue sur gel (E-gel®Size select™ Agarose gel, Invirtogen™, France) en comparant avec le marqueur de taille fourni.

La quantité et la qualité des produits purifiés ont été évaluées sur Bioanalyzer (Agilent Technology, France). Le produit correspondant à la taille attendu (503 pb) a été sélectionné pour passer à la phase d'amplification clonale puis au séquençage à haut débit. Le résultat issu du serveur du séquenceur a été converti en format FASQ. Ils ont été comparés aux séquences de référence (leurs propres séquences) dans le *pipeline* d'analyse « *Nonnoy* » sur le web service *Galaxy*. Ensuite ces résultats ont été également comparés à la grande banque de séquences regroupant toutes les séquences des nématodes. La différence de résultat a permis d'ajuster la performance du *pipeline* d'analyse *Nonnoy* avant de l'utiliser pour les échantillons étudiés.

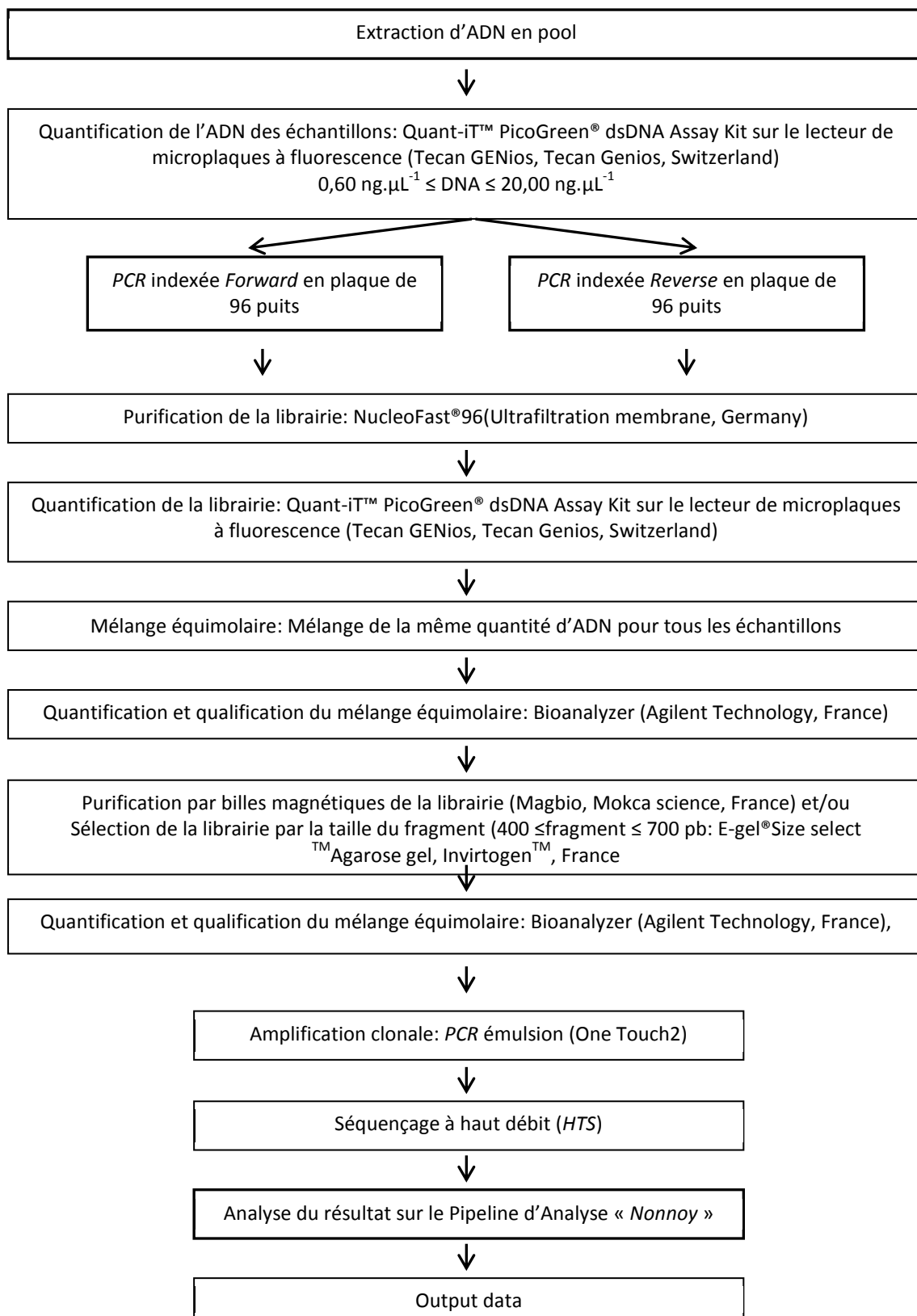


Figure 51 : Schéma du séquençage à haut débit pour l'identification des Anisakidae en plaque de 96 puits (un puits = un échantillon = ensemble des nématodes présents dans un organe ou une localisation corporelle d'un poisson).

III.10. Expériences en *qPCR* pour la transformation des résultats semi-quantitatifs du *HTS* en nombre d'*Anisakidae* relatif.

Le résultat issu du *HTS* est semi-quantitatif (des proportions de séquences permettent de déduire le pourcentage d'un taxon considéré) le gène *COX2* est un gène mitochondrial. Dans quelle mesure la différence du nombre de mitochondries entre les différents taxons identifiés biaise les proportions calculées. La *qPCR* développée permet de déterminer quel est le nombre de copies moyen de mitochondries quantifié par unité d'*Anisakidae* de la même espèce.

Afin d'effectuer la quantification absolue du nombre de copies d'ADN mitochondrial en *qPCR*, une gamme étalon d'ADN plasmidique d'*A. simplex* a été réalisée.

III.10.1. Clonage du locus *COX2* d'*Anisakis simplex*

Le clonage d'un produit *PCR*, utilisé comme insert a été réalisé en prenant pour matrice une extraction d'ADN d'*Anisakis simplex* (5Ani5a). Une *PCR* a été réalisée en utilisant le couple d'amorces F-univ-nem *COX2*/R-univ-nem *COX2* et les conditions de *PCR* établies pour le séquençage à haut-débit (seule modification les amorces utilisées ne portent pas de séquence code barre d'indexation). Le clonage a été effectué en utilisant le kit : TOPO TA Cloning (Invitrogen, France). L'extraction d'ADN plasmidique à partir des clones bactériens a été réalisée avec le kit Qiaprep Spin miniprep (Qiagen, France). La présence du fragment d'intérêt dans les plasmides des colonies choisies pour la culture a été vérifiée par *PCR*, trois produits *PCR* issus de clones ayant intégré le plasmide ont été séquencés par *Sanger* pour valider la séquence. La concentration de l'ADN extrait des plasmides a été quantifiée en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 à 260 nm (Thermo Scientific, France). A partir de la quantité d'ADN plasmidique, la quantité de copies du plasmide a été calculée. A partir de ce nombre de copies initial, la solution a été diluée pour atteindre une concentration de 10^{10} copies. μL^{-1} . La gamme a été réalisée en diluant de dix en dix (10^{10} , 10^9 , 10^8 ...jusqu'à 10^1 copies de plasmide). La gamme a été testée en utilisant le programme et le mélange réactionnel de *qPCR* élaborés pour tester leur efficacité des kits d'extraction (III.2.1). Après le test, les gammes étalons ont été dilués et congelés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

III.10.2. Expérience de *qPCR*

L'ADN provenant de cinq individus d'*Anisakis*, *Contraecum*, *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium* a été extrait individuellement en utilisant le kit Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, USA). La quantité et la qualité de l'ADN ont été évaluées sur le spectrophotomètre DeNovix à 260 nm (DeNovix®, France). Ces échantillons ont été amplifiés en *qPCR*, dont le mélange réactionnel pour un volume finale de 15 μL était constitué de : 7,50 μL de Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green *QPCR* Master Mix 2X, 300 nM en concentration finale pour chaque amorce F-univ-nem *COX2*/R-univ-nem *COX2*, 2 μL d'ADN (de façon à ne pas excéder 150 ng d'ADN par réaction) et 4,60

µL d'eau. Le programme de *qPCR* utilisé était le suivant : pré-dénaturation à 95 °C pendant 3 min, 45 cycles comprenant une dénaturation à 95 °C durant 5 sec, une hybridation à 57 °C pendant 10 sec, une élongation à 72 °C pendant 35 sec. La courbe de fusion a été réalisée de 70 à 95 °C sur l'appareil LightCycler 480 system II (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Le nombre d'Anisakidae nécessaires a été déterminé à 50 individus de chaque genre : *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium*. Les individus ont été identifiés morphologiquement pour définir leur genre. Ces Anisakidae ont été extraits individuellement en utilisant le kit Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, USA) et la quantité d'ADN a été mesurée par NanoDrop™ 2000 spectrophotometer à 260 nm (Thermo Scientific, France). Au total 3 runs de chaque genre de 50 individus ont été effectués pour tester la répétabilité de la méthode de *qPCR*. Les produits de *PCR* issus de la *qPCR* ont été envoyés à séquencer en *Sanger* à un prestataire extérieur. Les échantillons dont le résultat du séquençage *Sanger* correspondait aux espèces attendues ont été sélectionnés pour effectuer la *qPCR*.

III.11. Séquençage à haut-débit (PGM™ ION TORRENT) des échantillons étudiés

L'ADN des échantillons a été quantifié par le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit sur le lecteur de microplaques à fluorescence (Tecan GENios, Tecan Genios, Switzerland). Ils ont été ensuite classés dans l'ordre croissant en quantité d'ADN. Au total 438 échantillons ont été identifiés en *HTS* en suivant les étapes de la Figure 51.

IV. Analyse statistique des résultats

L'analyse des données a été réalisée en collaboration avec l'équipe des statisticiennes de l'Anses de Maisons-Alfort. Dans un premier temps, l'analyse descriptive des données a été réalisée à l'aide du logiciel SAS version 9.3. Ceci a permis d'avoir une vue globale des échantillons : les effectifs, la taille, le poids, la saison de prélèvement, la zone de pêche, le type de poisson (gras ou maigre) afin d'éviter l'absence de valeur aberrantes et de déterminer le type d'analyse statistique à réaliser par la suite.

Dans un deuxième temps, la prévalence et l'intensité des Anisakidae présents dans l'échantillon ont été analysées à l'aide du logiciel R version 2.1. Les modèles logistiques univariés et multivariés ont été utilisés pour étudier les facteurs influençant la prévalence d'*Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets. Pour ce faire, l'analyse univariée a été réalisée sur les neuf variables (sexe, taille, poids, espèce, famille de poisson, composition en matières grasses, zone de pêche, sous zone de pêche et saison). Afin de construire le modèle final qui explique le mieux la prévalence d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova* dans les filets, les différentes variables explicatives possibles ont tout d'abord été testées une à une dans ce modèle logistique univarié en se basant sur les critères tels que la

significativité de la variable et celle de l'AIC (Akaike Information Criteria) qui a permis de comparer la qualité de chaque modèle univarié. Ensuite l'analyse multivariée a été réalisée en prenant en compte comme variables explicatives des variables significatives mais non colinéaires les unes avec les autres. Les variables ont ensuite été rajoutées une à une dans le modèle, dans une démarche pas à pas ascendante sur la *P* value obtenue par l'analyse univariée et retenue pour le modèle final si le résultat du test de vraisemblance des modèles emboîtés était significatif. Issu de ce traitement des données, une prédiction de la prévalence dans les filets de poisson a pu également être réalisée.

Ces analyses ont permis de connaître le niveau d'infestation et la répartition des Anisakidae quantitativement au niveau du genre et qualitativement de niveau du genre et de l'espèce. Elles ont également mis en évidence des facteurs influençant la contamination des Anisakidae dans les espèces de poissons les plus consommées en France. L'analyse correspondance multiple a été également utilisée. Ce type d'analyse a permis de comparer la tendance les différents facteurs influençants sur la prévalence en Anisakidae.

Résultats et discussion

Cette quatrième partie concerne d'une part les résultats du développement de la méthode *HTS* pour l'identification des Anisakidae et d'autre part les résultats de la prévalence des Anisakidae dans les différents échantillons de poisson. Chaque partie comprend la description des résultats et la discussion correspondante.

I. Mise au point des différents modules techniques constituant la méthode HTS

I.1. Extraction de l'ADN à partir d'un mélange d'Anisakidae

Dans cette étude, l'appareil *Ultra-Turrax Tube Drive* a été choisi pour son efficacité et sa praticité (tube à usage unique permettant d'éviter la contamination croisée) afin de broyer un mélange de nématodes. La sélection de la méthode d'extraction, quant à elle, a été réalisée en deux phases. Les résultats de la première sélection sont présentés dans le Tableau XIX.

Tableau XIX : Première comparaison des quatre méthodes d'extraction d'ADN.

Méthodes d'extraction de l'ADN	Quantité d'ADN ($\eta\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, PicoGreen®, 50 μL d'éluat)	Qualité de l'ADN (Nanodrop™ 2000)		COX 2 qPCR Ct _{0,80 ng} à Ct _{25 ng}
		Ratio DO _{260nm} /DO _{280nm}	Ratio DO _{260nm} /DO _{230nm}	
WG (Wizard Genomic DNA purification kit)	96,00	1,99	1,33	10,60 - 14,44
NC (Nucleobond Column AXG kit)	109,80	1,78	1,80	10,88 - 14,37
QG (Qiagen Genomic-tip kit)	50,90	1,74	0,50	15,02 - 19,27
PC (Méthode Phénol-Chloroforme)	36,69	1,95	1,31	18,88 - 21,13

L'ADN extrait de 100 mg de nématodes a été quantifié en utilisant le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit contenant un agent intercalant et permettant la quantification de l'ADN double brin. La qualité de l'extrait d'ADN a été évaluée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop™ 2000 et par la *qPCR* où la valeur de Ct (*Cycle threshold* ou cycle de seuil) a été mesurée pour plusieurs dilutions de ces extraits d'ADN. La *qPCR* a permis d'évaluer la présence d'inhibiteurs en comparant les valeurs de Ct pour une gamme de concentrations d'ADN. Ce qui permet de déduire des efficacités de *PCR*. Dans ce cas précis, l'évolution de l'efficacité de la *PCR* sera corrélée à la présence d'inhibiteurs. Le Tableau XIX met en évidence que la méthode NC offre le meilleur rendement d'ADN (quantité d'ADN élué avec 50 μL de TE extrait de 100 mg de mélange d'Anisakidae). Les ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} ont montré une bonne qualité de l'ADN extrait. Les valeurs de Ct les plus basses (10,88 – 14,37) sont obtenues avec cette méthode. A concentration égale d'ADN introduit dans le système de *PCR* développée, plus la valeur de Ct est élevée, plus l'extrait d'ADN contient des inhibiteurs de *PCR* issus d'une mauvaise extraction de l'ADN. Concernant la méthode WG, la qualité de l'ADN extrait est

proche de celle de NC mais la valeur du ratio A_{260}/A_{230} plus faible indique la présence d'impuretés. Les deux autres méthodes QG et PC ont présenté des rendements très faibles par rapport aux autres méthodes, de plus leurs ratios A_{260}/A_{230} indiquent la présence d'impuretés, probablement des traces d'alcool issues des étapes de lavage. Cette faible qualité a été confirmée par les valeurs de Ct en *qPCR* qui sont jusqu'à 1,8 fois supérieures à celles de NC et WG.

La première sélection a permis de mettre en évidence que les méthodes d'extraction NC et WG étaient les meilleures parmi les quatre méthodes testées.

Tableau XX : Comparaison des deux meilleures méthodes d'extraction d'ADN sélectionnées. Valeurs obtenues à partir de 10 réplicats pour la méthode NC et 9 pour la méthode WG

Méthodes d'extraction d'ADN	Moyenne de quantités d'ADN min-max ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, PicoGreen®)	Moyenne des qualités d'ADN (Nanodrop™ 2000)		<i>COX2 qPCR</i> Ct _{0,62 ng} à Ct _{20 ng}
		Ratio $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$	Ratio $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{230\text{nm}}$	
WG (Wizard Genomic DNA purification kit)	$76,68 \pm 17,89^b$ (46,25 – 104,93)	$1,83 \pm 0,04^b$	$0,73 \pm 0,07^b$	11,73 - 15,40
Nombre d'essais	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9
NC (Nucleobond Column AXG kit)	$101,52 \pm 6,41^a$ (91,45 – 109,34)	$1,95 \pm 0,10^a$	$1,07 \pm 0,14^a$	10,90 - 14,48
Nombre d'essais	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10

Le Tableau XX montre le même type de comparaison que pour les expérimentations précédentes, mais cette dernière a été réalisée sur : 9 essais d'extraction pour la méthode WG et 10 pour NC. La méthode NC est demeurée celle présentant les meilleurs résultats qualitatifs et quantitatifs. La concentration moyenne d'ADN extrait par la méthode NC ($101,52 \pm 6,41 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) était supérieure à celle de WG ($76,68 \pm 17,89 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) avec un écart type qui est presque trois fois inférieur. Les moyennes marquées avec différentes lettres a et b sont significativement différentes à un risque d'erreur de 5% (test statistique Kruskal-Wallis). De plus, les valeurs de concentrations d'ADN obtenues pour NC s'écartent moins de la valeur moyenne ($91,45 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} - 109,34 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) par rapport à celle de WG ($46,25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} - 104,93 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). En termes de qualité d'ADN, les deux ratios de densité optique A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} étaient significativement supérieurs pour NC, au seuil de 5 % d'erreur, par rapport à WG. Grâce au système de filtration sur une résine échangeuse d'anions, la méthode NC a permis d'obtenir un ADN de meilleure qualité et en plus grandes quantités, les valeurs de Ct sont associées à une moindre concentration d'inhibiteurs. Plusieurs études ont montré qu'à cause de la structure très complexe de la cuticule des nématodes, ceux-ci résistent au broyage et à la digestion enzymatique, il est très difficile d'obtenir de l'ADN en quantité et qualité suffisante pour la réalisation de *HTS* (Dawkins et Spencer, 1989 ; McManus *et al.*, 1985).

Le kit Genomic DNA and total RNA purification NucleoBond AXG Columns (NC, Macherey-Nagel) a été retenu pour réaliser les extractions à partir des échantillons de l'étude. Les raisons qui nous ont conduits à ce choix sont les suivants ; bons rendements d'extraction d'ADN, bonne qualité de l'ADN extrait, répétabilité des extractions, faible prix et sécurité pour le manipulateur (produits moins toxiques).

Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée "Monitoring of four DNA extraction methods upstream of high-throughput sequencing of Anisakidae nematodes" dans le journal *Journal of Microbiological Methods* en mai 2014 (Annexe 4).

I.2. Détermination des conditions de la PCR pour la préparation de la librairie de HTS

Les résultats obtenus ci-dessus en *qPCR* ont permis de déduire les limites basses et hautes de la quantité d'ADN utilisable ainsi que le nombre de cycles pour la *PCR* de librairie nécessaires pour la préparation de la matrice de séquençage en *HTS*.

Lors de la deuxième phase comparative des méthodes d'extraction d'ADN, la quantité d'ADN obtenue par la méthode NC a été diluée au demi en cascade pour former une gamme : 20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 et 0,62 ng. μL^{-1} . La quantité d'ADN comprise entre 0,6 ng. μL^{-1} et 20 ng. μL^{-1} a été illustrée par la valeur de Ct obtenue, la limite haute a donc été fixée à 20 ng. μL^{-1} . La limite basse a été fixée à 0,6 ng. μL^{-1} . En dehors de la plage 0,6 - 20 ng. μL^{-1} , la *PCR* risquait de ne pas donner des résultats satisfaisants à cause d'une quantité d'ADN insuffisante ou, pour les fortes concentrations avec possibilité d'engendrer un phénomène de rétro-inhibition. Les échantillons dont la concentration d'ADN était inférieure à 0,6 ng. μL^{-1} ont été écartés et ceux de plus de 20 ng. μL^{-1} ont été normalisés à 20 ng. μL^{-1} afin de limiter le risque d'obtenir des faux-négatifs ou d'engendrer des biais faussant les valeurs mesurées.

Concernant les cycles de *PCR*, le nombre de cycles a été limité à 30 pour les échantillons dont la concentration d'ADN était comprise entre 0,6 à 9,30 ng. μL^{-1} ou 32 cycles pour ceux compris entre 9,30 à 20 ng. μL^{-1} , afin de conserver le caractère quantitatif de l'amplification. En effet, en phase exponentielle de la *PCR*, le nombre d'amplicons augmente en fonction de la quantité d'ADN initiale. En revanche, lors de la phase stationnaire l'aspect quantitatif disparaît et le résultat de l'expérience ne permettrait donc pas d'estimer la proportion des différents genres présents dans le mélange d'ADN extrait. En effet, les échantillons dont la concentration d'ADN était basse (0,6 à moins de 9,30 ng. μL^{-1}), nécessitaient plus de cycles de *PCR* pour permettre d'obtenir *in fine* une librairie quantifiable. Certes le bruit constitué par les autres produits *PCR* indésirables pourrait augmenter en conséquence mais ceux-la étaient filtrés par le *Pipeline* d'analyse *Nonnoy*. L'objectif de ce travail de thèse étant d'identifier les nématodes infestant les échantillons de poissons et de déterminer

l'intensité de chaque genre/espèce de nématodes, il était donc indispensable d'intégrer ce point quantitatif lors du développement de l'outil d'identification des espèces d'Anisakidae.

I.3. Base de données

Cette base de données comporte un total de 1 247 séquences dont 1 127 séquences d'Anisakidae (Tableau XXI) et 120 séquences d'autres nématodes (Tableau XXII). Les séquences d'autres nématodes permettent de tester la spécificité du workflow analytique dans sa globalité (préparation de la librairie et *pipeline* d'analyse).

Tableau XXI : Espèces d'Anisakidae présentes dans la base de données locale pour le *pipeline* d'analyse Nonnoy
Nombre de séquences sélectionnées par espèce organisées par ordre alphabétique du genre et nombre de séquences décroissant

Espèce Anisakidae	Nombre de séquences	Espèce Anisakidae	Nombre de séquences
<i>Anisakis simplex</i>	319	<i>Contraecaecum margolisi</i>	3
<i>Anisakis pegreffii</i>	284	<i>Contraecaecum mirounga</i>	3
<i>Anisakis typica</i>	34	<i>Contraecaecum radiatum</i>	3
<i>Anisakis brevispiculata</i>	17	<i>Contraecaecum bioccai</i>	3
<i>Anisakis ziphidarum</i>	15	<i>Hysterothylacium aduncum</i>	203
<i>Anisakis physeteris</i>	14	<i>Hysterothylacium deardorffoverstreetorum</i>	50
<i>Anisakis</i> sp.	11	<i>Hysterothylacium</i> sp.	38
<i>Anisakis paggiae</i>	1	<i>Hysterothylacium fabri</i>	2
<i>Contraecaecum osculatum</i>	81	<i>Pseudoterranova krabbeii</i>	22
<i>Contraecaecum rudolphii</i>	10	<i>Pseudoterranova ceticola</i>	5
<i>Contraecaecum ogmorhini</i>	3	<i>Phocascaris cystophorae</i>	3
<i>Contraecaecum</i> sp.	3		
Total séquences		1 127	

Tableau XXII : Liste des séquences des autres nématodes récoltées pour l'élaboration de la banque de données locale dans le Pipeline d'analyse Nonnoy organisées par ordre alphabétique du genre et de nombre de séquences décroissant.

Autres nématodes	Nombre de séquences	Autres nématodes	Nombre de séquences
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	<i>Oesophagostonum dentatum</i>	1
<i>Ascaris</i> sp.	2	<i>Oesophagostonum quadrispinulatum</i>	1
<i>Ascaris suum</i>	1	<i>Onchocerca flexuosa</i>	1
<i>Acanthocheilonema vitae</i>	1	<i>Radopholus similis</i>	1
<i>Ancylostoma caninum</i>	1	<i>Pristionchus pacificus</i>	1
<i>Angiostrongylus vasorum</i>	1	<i>Punctodera chaltoensis</i>	1
<i>Baylisascaris schroederi</i>	3	<i>Staria digitata</i>	1
<i>Baylisascaris columnaris</i>	2	<i>Steinernema carpocapsae</i>	1
<i>Baylisascaris transfuga</i>	2	<i>Strongyloides stercoralis</i>	1
<i>Baylisascaris ailuri</i>	1	<i>Toxocara canis</i>	5
<i>Bunostomum phlebotomum</i>	1	<i>Toxocara cati</i>	4
<i>Brugia malayi</i>	1	<i>Toxocara vitulorum</i>	1
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	1	<i>Toxocara malaysiensis</i>	1
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	46	<i>Toxascaris ailuri</i>	1
<i>Caenorhabditis elegans</i>	4	<i>Toxocaris leonina</i>	3
<i>Caenorhabditis</i> sp.	1	<i>Trichinella spiralis</i>	2
<i>Cooperia oncophora</i>	2	<i>Teladorsagia boreoarcticus</i>	1
<i>Cucullanus robustus</i>	1	<i>Trichinella unverified</i>	1
<i>Cylicocyclus insignis</i>	1	<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	1
<i>Dracunculus medinensis</i>	1	<i>Trichuris suis</i>	1
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	<i>Trichuris trichiura</i>	1
<i>Haemonchus contortus</i>	1	<i>Trichuris ovis</i>	1
<i>Heterodera cardiolata</i>	1	<i>Trichuris discolor</i>	1
<i>Heterodera glycines</i>	1	<i>Thelazia callipaeda</i>	1
<i>Heliconema longissimum</i>	1	<i>Wuchereria bancrofti</i>	4
<i>Loa loa</i>	1	<i>Wellcomeia siamensis</i>	1
Total séquences		120	

I.4. Design du couple d'amorces pour la PCR pour la préparation de la librairie de HTS

Le design d'amorces a été réalisé à partir des 1 127 séquences d'Anisakidae (*Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, *Hysterothylacium* et *Phocascaris* dans le Tableau XXI. Les séquences constitutives de la base de données ont été alignées à l'aide de l'algorithme MUSCLE au sein du logiciel Unipro UGENE (32-bit version/v1.12.1/10 Juillet 2013). Les *loci* montrant un maximum de conservation ont servi de support au design des amorces. La spécificité des amorces a été vérifiée avec l'algorithme BLASTn. Le Tableau XXIII propose les caractéristiques du couple d'amorces choisi. Le couple d'amorces choisi est le F-univ-nem COX2 et R2-univ-nem COX2.

I.5. Pipeline d'Analyse « Nonnoy »

Ce *pipeline Nonnoy* permet le traitement des informations biologiques générées par le séquençage haut-débit d'un fragment du gène de six runs de séquençage *HTS*. Le *pipeline* composé de différents outils nécessaires a permis d'effectuer un *BLASTn* sur une base de données de séquences locale. Son efficacité a été démontrée par l'ensemble des résultats *HTS* obtenus.

I.6. Résultats de l'expérience pilote de séquençage haut-débit

Les Tableaux XI, VI et la Figure 56 synthétisent les résultats issus du séquençage pilote effectué sur la puce 314 Chip V2. Ce pilote a permis de tester le séquençage *HTS* avant de l'appliquer aux échantillons réels. Le Tableau XXV récapitule le résultat du séquençage. Le rapport de séquençage (Annexe 8) contenait plusieurs mesures telles que l'histogramme faisant état de la distribution des tailles de reads, une heatmap qui a permis d'obtenir une carte de densité illustrant le taux de chargement en billes ISP du support de séquençage. Un ensemble de paramètres associés à la qualité du séquençage est ensuite communiqué comme le débit global en nombre de bases et en nombre de reads séquencés, le taux de billes ISP vivantes et enfin, les volumes de séquences associés à chaque index numéroté de 1 à 5. Le nombre total de séquences (reads) obtenues a été de 417,321 séquences avec un chargement de 55 % des puits disponibles (voire heat map, Annexe 8). Ce résultat est jugé conforme aux spécifications attendues, par le fabricant, pour cette puce 314™v2 Chip à 100 000 séquences. La longueur moyenne des séquences était de 256 pb. Le taux de séquences polyclonales était assez élevé, de l'ordre de 23 % comparativement au taux attendu inférieur à 20 %. En revanche le taux de dimères d'amorces très bas, inférieur à 1 %. Ce taux de séquences polyclonales élevé indique qu'il semble nécessaire de réajuster le ratio bille ISP / librairie. Le taux de dimères d'amorces relativement faible montre que la purification de la librairie a été efficace, ce qui valide ces étapes techniques. Les 5 index présents étaient équilibrés en nombre de séquences produites. Les résultats valident donc le dosage des librairies et le mélange équimolaire, néanmoins certaines étapes peuvent être optimisées comme l'emPCR (emulsion PCR) avec la réduction du pourcentage de polyclonaux. Le résumé du séquençage est montré dans la Figure 51.

Tableau XXV : résumé des caractéristiques techniques du run pilote de séquençage HTS sur la puce 314 Chip V2

Caractéristiques	données	validation
quantité d'ADN de librairie introduit dans l'emPCR (pmol)	26	Oui
Nombre total de bases séquencées (Mpb)	106,98	Oui
Nombre total de reads issus du HTS	417 321	Oui
Longueur moyenne des séquences (pb) issues du HTS	256	Oui
Test fragment TF_A (%)	94%	Oui
Nombre de puits disponibles sur la puce	1 262 519	Oui
Puits avec ISPs	nombre	696,683
	%	55
ISP vivant	nombre	654,701
	%	94
Enrichissement	nombre	629 414
	%	94
Polyclonalité	nombre	146 056
	%	23
Dimère d'amorces	nombre	443
	%	<1%

Tableau XXVI : Comparaison des proportions des différents genres dont l'ADN a été extrait avec les proportions obtenues en HTS séquences de pilote de séquençage obtenues (%) et le composant de Benchmark.

Genres	Mélange A		Mélange B		Mélange C		Mélange D		Mélange E	
	Volumes introduits dans le mélange (%)	Séquences obtenues après HTS (%)	Volumes introduits dans le mélange (%)	Séquences obtenues après HTS (%)	Volumes introduits dans le mélange (%)	Séquences obtenues après le HTS (%)	Volumes introduits dans le mélange (%)	Séquences obtenues après le HTS (%)	Volumes introduits dans le mélange (%)	Séquences obtenues après le HTS (%)
<i>Anisakis</i>	25	12,54	75	85,10	2	7,45	75	87,19	0	9,75
<i>Contraecaecum</i>	25	0,01	3	0	20	0	3	4,57	50	0
<i>Pseudoterranova</i>	25	87,4	2	14,57	75	92,22	2	5,24	50	90,22
<i>Hysterothylacium</i>	25	0,02	20	0,32	3	0,31	20	2,99	0	0
Autres nématodes	0	0,03	0	0,01	0	0,02	0	0,01	0	0,03
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Dans cette expérience pilote, 4 mélanges (A, B, C et E) des ADN extraits des 4 genres ont été réalisés selon des proportions connues au départ (1ère colonne de chaque mélange). Pour le mélange D, les vers nématodes ont été mélangés selon les proportions du mélange B puis l'ADN a été extrait à partir de ce mélange. Dans la seconde colonne, sont indiquées pour chaque mélange, les proportions relatives des séquences identifiées après HTS comme appartenant aux différents genres d'Anisakidae.

Dans ce Tableau XXVI, les colonnes dénommées mélange A à mélange E sont des mélanges artificiels des ADN des 4 genres d'Anisakidae (*Anisakis*, *Contraecaecum*, *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium* en différentes proportions. Le résultat en nombre de séquences (reads) calculé en pourcentage est dans la colonne séquences obtenues doit être cohérent avec la proportion des

volumes introduits dans le mélange au départ. Le Tableau XXVI montre que pour le mélange A, aucun résultat de pourcentage de séquences ne correspond à la proportion d'ADN qui a été mise au départ. En ce qui concerne les mélanges B et C seul le genre majeur correspond à ce qui a été mis au départ. Pour le mélange D le pourcentage de séquences obtenues est proche de ce qui a été mis au départ, mise à part le pourcentage d'*Hysterothylacium*. Enfin, le mélange E ne présente aucune concordance des résultats, de plus il y a une apparition d'autres séquences ne correspondant pas aux 4 genres d'Anisakidae. Suite au résultat du mélange D qui est issu de l'extraction réelle et non pas mélangé artificiellement, ce résultat de pilote montre qu'il est difficile d'obtenir un résultat correspondant à ce qui est attendu et de concevoir un *Benchmark* permettant de valider ces approches métagénomiques. Il en va de même avec les résultats issus de benchmark bactériens. A ce jour si les approches métagénomiques 16S par l'intermédiaire du séquençage haut-débit, sont très répandues, il n'existe pas d'études validant formellement une approche technique ou bioanalytique par l'intermédiaire de Benchmark. Néanmoins, le mélange D étant celui qui mime le mieux la façon dont seront traités nos échantillons réels, les résultats de cette expérience pilote étaient encourageants et nous permettait de valider l'utilisation du *HTS* à plus grande échelle sur des échantillons réels. Ce pilote a permis d'apporter la preuve de la faisabilité technique d'une identification massale de nématodes prélevés de poissons.

Pour cette partie de développement des différents outils nécessaires pour le *HTS*, l'efficacité de cet outil *HTS* a été assurée par différents choix techniques : i) l'utilisation d'une Taq polymérase haute-fidélité a permis de limiter les erreurs (cette Taq est 6 fois plus fidèle que les Taq classiques). Cette polymérase dispose d'une activité exonucléasique dans le sens 3' – 5' lui permettant une relecture des erreurs d'amplification pendant la *PCR* de librairie ; ii) les amorces utilisées sont spécifiques des Anisakidae et plus particulièrement pour les genres *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium* ; iii) une phase permettant une sélection sur la base de la taille des amplicons grâce au « *e-gel size select* » a permis de limiter les artefacts de séquençage ; iv) l'utilisation d'un filtre permettant la sélection des séquences répondant à la qualité attendue dans le pipeline d'analyse Nonnoy (élimination des chimères et des séquences trop courtes ou trop longues) ; v) la librairie a été réalisée en mode bidirectionnelle (sens et en anti-sens), les reads produits par échantillon sont donc l'image des deux brins ; vi) l'utilisation de la plateforme PGM™ Ion Torrent a permis une fiabilité supérieure à « Q20 », soit une probabilité d'erreur inférieure à une erreur toutes les 100 paires de bases. C'est-à-dire que l'amplification peut produire 5 erreurs maximum pour des reads atteignant la taille totale théorique de l'amplicon, la taille moyenne des reads obtenus étant de 179 à 271 pb la quantité absolue d'erreurs en est réduite d'autant. Ainsi le nombre maximum d'erreurs pour une séquence était de 2 ou 3 ; vii) avant l'étude réelle, un pilote

de séquençage a été réalisé afin de s'assurer de la faisabilité technique de la méthode. Bien que la limite théorique de la longueur de séquence soit limitée à 400-500 pb pour la plateforme PGM™ Ion Torrent, cette étude a montré des résultats corrects et satisfaisant pour l'amplicon de 503 pb.

En termes de méthode d'identification des nématodes Anisakidae, comme présenté dans la partie introductive, il existe plusieurs types de méthodes allant de très basique comme l'identification morphologique au plus complexe comme le séquençage à haut-débit. L'identification morphologique possède des inconvénients : elle prend du temps, demande de l'expérience, reste insuffisante pour certaines classifications et ne permet une identification qu'au niveau du genre (Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Smith et Wootten, 1978). A ce jour, une méthode de séquençage *HTS* pour les nématodes du sol a été développée (Darby *et al.*, 2013 ; Porazinska *et al.*, 2009) mais aucune méthode spécifique n'a été décrite pour les Anisakidae. Ce travail initie le séquençage *HTS* pour les Anisakidae, parasites pathogènes pour l'homme. Dans le cadre du traitement d'un grand nombre d'échantillons, le budget et le temps nécessaires peuvent conduire à la réduction du nombre d'échantillons. Mais il apparaît plus pertinent statistiquement de pouvoir considérer l'intégralité des échantillons. L'approche *HTS* est un choix qui permet de traiter l'ensemble des échantillons sur un temps réduit pour un coût moindre (Porazinska *et al.*, 2009). Le développement d'une méthode d'identification basée sur le séquençage *HTS* des nématodes a répondu à ce besoin accompagné par le développement d'une méthode d'extraction d'ADN en pool. Il est difficile d'obtenir un ADN de qualité et quantité acceptables compte tenu des propriétés physiques et chimiques des nématodes (Dawkins et Spencer, 1989 ; McManus *et al.*, 1985). De plus, certains genres parmi les Anisakidae, comme *Contraecum*, sont de petite taille et possèdent une couche de collagène imperméable (cuticule) qui peut rendre l'extraction difficile.

L'utilisation d'un BLASTn local a permis de gagner du temps par rapport à une analyse en ligne pour la consultation des bases de données permettant l'exploitation d'un nombre conséquent de données par le *HTS*. Chaque étape du *pipeline Nonnoy* a permis de sélectionner des séquences présentant une qualité suffisante pour les analyses ultérieures. En effet, la présence de séquences de mauvaise qualité pourrait fausser l'identification taxonomique.

Faire la différence entre des séquences rares associées à des taxons rares et le bruit associé aux séquences entachées d'erreurs a nécessité d'optimiser les paramètres analytiques. Pour éliminer des séquences associées à ce bruit (les échantillons donnant un nombre de séquences très bas en *HTS*), aucun seuil fixé n'existe (Pompanon *et al.*, 2012). Certaines études ont écarté les espèces dont la séquence était présente moins de quatre fois (Rayé *et al.*, 2011 ; Valentini *et al.*, 2009), d'autres études se sont basées sur l'étude des chimères en créant un arbre phylogénétique des séquences erronées comparées à une bonne séquence afin de les comparer et d'établir le seuil (Quince *et al.*,

2011). Le risque sur le traitement du bruit est de supprimer les espèces rares. Dans la présente étude, les espèces dont la séquence était présente moins de 6 fois ont été écartées. Pour les études métagénomiques menées habituellement sur la Plateforme PGM™ Ion Torrent, la plateforme PEGASE supprime les espèces contenant moins de 1 % des séquences totales les assimilant à un bruit de fond. Mais, dans cette étude, un *run* contenait 96 index qui correspondent aux nématodes collectés à partir de 96 échantillons. Un échantillon représente une localisation corporelle de poisson. Ainsi, un index (ou échantillon) peut contenir un nombre de parasites (de 11 à 2500 nématodes). Le « 1 % de séquences totales » pouvait varier d'un index à l'autre, ainsi le fait de supprimer des séquences présentes à moins de 1 % n'était pas adapté ici. En analysant les résultats de chaque index, les séquences d'espèces non-décrites comme parasites du poisson étaient inférieures à 6, c'est pourquoi le seuil a été fixé à 5 séquences par index. Un total minimum de 10 000 séquences après l'identification par le *pipeline* d'analyse pour un index permet de valider le séquençage et de traiter les données sur le PGM™ Ion Torrent (Whiteley *et al.*, 2012). Ainsi, les index pour lesquels moins de 10 000 séquences ont été recensées ont été éliminés. Pour le traitement des résultats issus du *HTS*, en métagénomique, toutes les séquences de bonne qualité sont prises en compte quel que soit le nombre de séquences.

La base que nous avons constituée pour les besoins de cette étude pourra être mise à jour lorsque de nouvelles séquences d'Anisakidae seront déposées dans les bases de données internationales. Des séquences substantiellement présentes au sein des échantillons traités dans le cadre de cette étude pourraient ne s'aligner qu'imparfaitement avec les séquences constitutives de la base de données.

1.7. Estimation du nombre de copies d'ADN mitochondrial des Anisakidae par qPCR

Ce gène *COX2* est un gène mitochondrial. Une cellule comporte plusieurs mitochondries. Ce gène est donc présent en multiple copies au sein d'une cellule. Nous voulions vérifier que d'un genre d'Anisakidae à un autre, le nombre de copies d'ADNm (ADN mitochondrial, et donc du gène *COX2*) était sensiblement équivalent. Si ce nombre était radicalement différent d'un genre à l'autre, cette différence du nombre de copies d'ADNm par unité de génome pourrait constituer un biais faussant les proportions calculées en sortie de *pipeline*. La détermination de ces quantités de copies si elles étaient corrélées aux genres des Anisakidae étudiés ici pourrait permettre d'apporter un facteur correctif en sortie de *pipeline*. Le calcul de transformation du nombre de séquence issu du *HTS* en nombre de parasite relatif est détaillé dans Annexe 12. Pour déterminer le nombre de copies d'ADNm, le gène présent en une seule copie mitochondriale, *COX2* a été utilisé comme cible de la *qPCR*. Une extraction d'ADN d'*A. simplex* (146,7 ng.μL⁻¹) a été utilisée pour le clonage de la cible de *qPCR*. La *PCR* a été réalisée en utilisant le couple d'amorces F-univ-nem *COX2* / R2-univ-nem *COX2*

(440 pb) (voire partie III.4.1 Condition de la PCR de librairie. Une gamme d'étalon a été réalisée en utilisant des dilutions sériées par pas de 10 de l'ADN plasmidique réalisé lors de l'étape de clonage de la cible.

La quantité de mitochondries a pu être estimée pour des individus appartenant à trois genres : *Anisakis* spp. (44 individus), *Pseudoterranova* spp. (66 individus) et *Contracaecum* spp. (60 individus). La plupart des espèces au sein de ces trois genres étaient *A. simplex* (44 individus), *C. osculatum* (60 individus), *P. krabbei* (59 individus). Parmi ces individus, ceux dont le résultat du *Sanger* ne permettait pas d'identifier l'espèce, ont été désignés dans la catégorie ND. Pour *Hysterothylacium* spp., la *qPCR* a permis de détecter sa présence mais pas d'en quantifier les mitochondries. Les séquences du gène *COX2* des individus appartenant au genre *Hysterothylacium* sont nettement plus différentes de celles des 3 autres genres, induisant des problèmes d'amplification. La quantification du nombre de mitochondries pour ce genre nécessiterait l'utilisation d'un autre couple d'amorces. Le nombre de mitochondries obtenues est présenté dans Tableau XXVII.

Tableau XXVII : Moyennes et variations du nombre de mitochondries pour chaque genre d'Anisakidae.

	Nombre d'individus	Nombre moyenne de copie d'ADN mitochondrial par individu	Nombre mitochondries final (moyenne des 3 genres) par individu
<i>Anisakis</i>	44	7,66E+06 ± 1,12E+07	
<i>Contracaecum</i>	60	2,63E+07 ± 2,53E+08	2,24E+07 ± 1,58E+08
<i>Pseudoterranova</i>	66	3,33E+07 ± 6,85E+07	

La gamme étalon a permis de réaliser une droite de régression, celle-ci a servi à calculer la concentration en ADNm de chaque échantillon (Tableau XXVII). Avec les quantités de mitochondries obtenues, un traitement statistique des résultats a été réalisé à l'aide du logiciel R version 3.2.0.

Deux tests statistiques ont été envisagés pour étudier l'existence ou l'absence de différences significatives dans les données de quantité de copie d'ADNm : l'ANOVA (*Analysis of Variance*) et le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis.

Les hypothèses préalables au test de l'ANOVA (normalité des résidus et homogénéité des variances) n'ont pas été vérifiées, il convient donc d'utiliser un test de type non-paramétrique. Le test de Kruskal-Wallis a donc été utilisé suivi d'une comparaison par paire à l'aide du test Rank Sum de Wilcoxon qui a permis d'évaluer les différences inter-genre ou inter-espèce du nombre de mitochondries. Les données ont été normalisées par une transformation en log (X+1). Les valeurs atypiques (anormalement élevées ou basses) ont été supprimées.

1.7.1. Etude des différences inter-genre

Le test de Kruskal-Wallis a conduit à l'obtention d'une *p-value* de 4,704e-13, largement inférieure au seuil de significativité de 0,05. Ainsi, ce test a montré qu'il existe une différence significative du nombre de mitochondries entre les différents genres d'Anisakidae. Plus précisément, la réalisation d'un test Rank Sum de Wilcoxon a mis en évidence qu'il y avait des différences significatives du nombre de mitochondries ($p < 0,05$) entre tous les genres, à l'exception de *Contraecum* et du genre non-déterminé pour lesquels aucune différence significative n'est observée. Il y a donc des différences significatives entre les trois genres au niveau du nombre de mitochondries (Tableau XXVIII).

Tableau XXVIII : Résultat de *p-value* du test Rank Sum de Wilcoxon pour la mise en évidence de différences significatives du nombre de mitochondries entre les genres d'Anisakidae.

	<i>Anisakis</i>	<i>Contraecum</i>	ND
<i>Contraecum</i>	0,041	-	-
ND	0,011	1,00	-
<i>Pseudoterranova</i>	2,1e-04	1,6e-09	5,7e-08

$p < 0,05$ = différence significative. ND ; Anisakidae dont l'espèce est non déterminée.

1.7.2. Etude des différences inter-espèce

Le test de Kruskal-Wallis a conduit à l'obtention d'une *p-value* de 1,996e-13, largement inférieure au seuil de significativité de 0,05. Il existe donc une différence significative du nombre de mitochondries entre les espèces d'Anisakidae testées. Selon le résultat du test Rank Sum de Wilcoxon, il n'y a pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre le nombre de mitochondries d'*A. simplex* et de *C. osculatum*, entre *Contraecum* et ND et entre *P. decipiens* et *P. krabbei*.

Tableau XXIX : Résultat de *p-value* du test Rank Sum de Wilcoxon pour la mise en évidence de la différence significative du nombre de mitochondries entre les espèces d'Anisakidae.

	<i>A. simplex</i>	<i>C. osculatum</i>	ND	<i>P. decipiens</i>
<i>C. osculatum</i>	0.06895	-	-	-
ND	0.01750	1.00000	-	-
<i>P. decipiens</i>	0.00044	3.2e-05	5.0e-06	-
<i>P. krabbei</i>	0.00464	5.8e-08	9.6e-07	0.07655

$p < 0,05$ = différence significative. ND ; Anisakidae dont l'espèce est non déterminée.

La Figure 54 montre que la distribution du rapport de la quantité de mitochondries sur la quantité d'ADN était globalement similaire au sein des différentes espèces d'Anisakidae. Quelques valeurs «extrêmes» ont été observées pour *A. simplex* et *C. osculatum*.

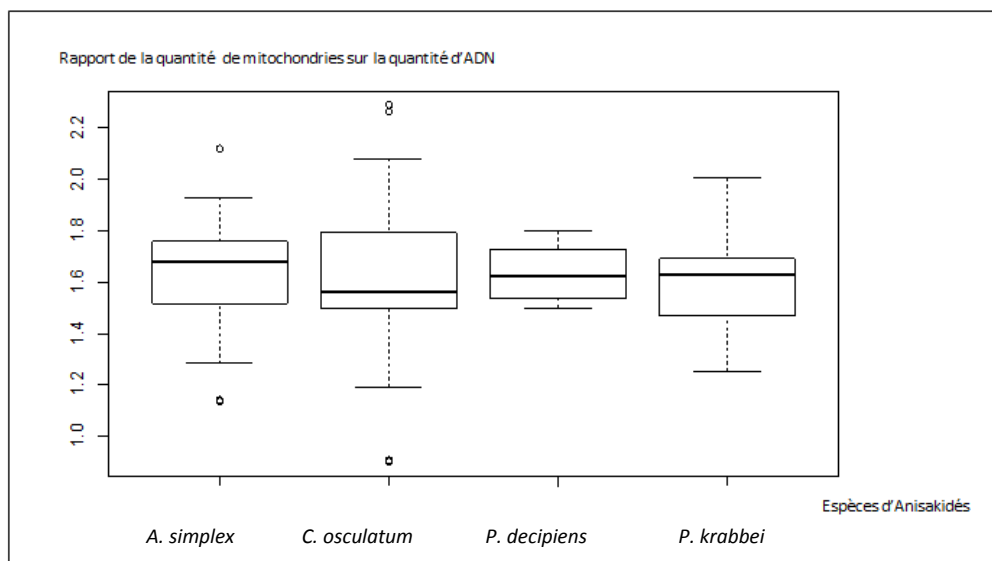


Figure 54 : Boxplot illustrant le rapport de la quantité de mitochondries en fonction de la quantité d'ADN pour chaque espèce d'Anisakidae (même échantillons du test statistique).

Finalement, cette *qPCR* a permis d'estimer le nombre de copies du gène *COX2* et ainsi le nombre de mitochondries par échantillon. Les résultats des proportions relatives pourraient théoriquement être corrigés en tenant compte du biais inhérent aux quantités différentes de gènes *COX2* (et donc de mitochondries) par unité de nématode selon le genre/espèce de ce dernier (cela impliquerait d'avoir réalisé des *qPCR* pour connaître le nombre de copies de *COX2* par unité de genre ou d'espèce pour tout ce qui a été identifié par *HTS*).

Le résultat a montré qu'il y avait de la variabilité au sein des individus d'une même espèce. L'écart-type des 3 répétitions pour un individu était bien plus petit que la valeur du nombre de mitochondries moyenne des 3 répétitions. Mais l'écart-type total pour tous les individus était plus grand que la moyenne des 3 répétitions (*Contraecaecum* spp. et *Pseudoterranova* spp.), ceci montre la variabilité du nombre de mitochondries au sein d'un même genre. Cette variabilité peut être corrélée à la taille de parasites.

Jusqu'à présent, aucune étude de métagénomique issue du séquençage *HTS* n'avait estimé le nombre de copies d'ADN mitochondrial pour l'obtention d'une quantification relative des échantillons. Une étude ciblant les nématodes du sol s'était basée sur le *HTS* avec une petite quantité d'échantillons connus. L'efficacité du *HTS* a été prouvée par les taxonomies obtenues correspondant aux proportions et diversités présentes réellement dans l'échantillon analysé (Porazinska *et al.*, 2009). Dans notre cas, il est impossible de connaître des échantillons de départ d'où un autre intérêt de la méthode *HTS* choisie.

Le nombre de mitochondries des nématodes a été étudié principalement chez *Caenorhabditis elegans* (Tsang et Lemire, 2002). Chez ce nématode, aux stades L1, L2 et L3, le nombre de mitochondries n'évolue pas et a été évalué en *qPCR* à 25 000 par embryon. Ce n'est qu'à partir du stade L4 que le nombre de mitochondries s'accroît d'un facteur 6 chez l'adulte hermaphrodite et d'un facteur 2 chez le mâle adulte. La présente étude était moins aisée que celle de *C. elegans* puisque les Anisakidae ne peuvent être obtenus que par collecte dans des échantillons de poisson et restent non-cultivables en aval de la collecte, contrairement à *C. elegans*. Malgré la connaissance du stade larvaire des Anisakidae, l'âge ou encore l'état était inconnu.

Méthodes utilisées

- **Développement et validation d'une méthode HTS** pour l'identification des nématodes parasites isolés de poissons et des Anisakidae.
- Au total **19 242 017** séquences issues de six runs de séquençage ont été traitées en utilisant un fragment du gène cible *COX2* d'une taille de 440 pb.
 - **HTS** : 47 706 nématodes provenant de 773 localisations corporelles.
 - **Sanger** : 6 677 nématodes provenant de 809 localisations corporelles.
- Grande capacité d'identification des Anisakidae en *HTS* à **moindre coût** et pour **un temps analytique relativement faible**.
- Le *HTS* ou le séquençage de deuxième génération :
 - Identification **semi-quantitative**.
 - **Quantification d'ADN mitochondrial en qPCR** : semi-quantitatif → quantification relative.
- Mise en ligne du **pipeline** d'analyse **Nonnoy** sur le site internet de Gènes Diffusion (<http://www.biorigami.com>).

II. Analyse descriptive des échantillons de poisson de l'étude

Cette partie permettra de réaliser une description de l'ensemble des poissons récoltés pour l'étude des Anisakidae.

II.1. Espèces échantillonnées

Au total, 1 795 poissons de 31 espèces de poissons ont été échantillonnés. Vingt-sept individus appartenant à 13 espèces différentes ont été exclus de l'étude car leur effectif par espèce (1 à 5 individus) était trop faible. Ainsi, seuls 1 768 individus appartenant à 18 espèces ont été sélectionnés dans notre étude car les effectifs étaient compris entre 20 et 170 individus par espèce (Figure 55). Les cinq espèces contenant le plus grand nombre d'individus étaient : le merlan (*Merlangius merlangus*), le merlu (*Merluccius merluccius*), l'anchois (*Engraulis encrasicolus*), le cabillaud (*Gadus morhua*) et la sardine (*Sardina pilchardus*).

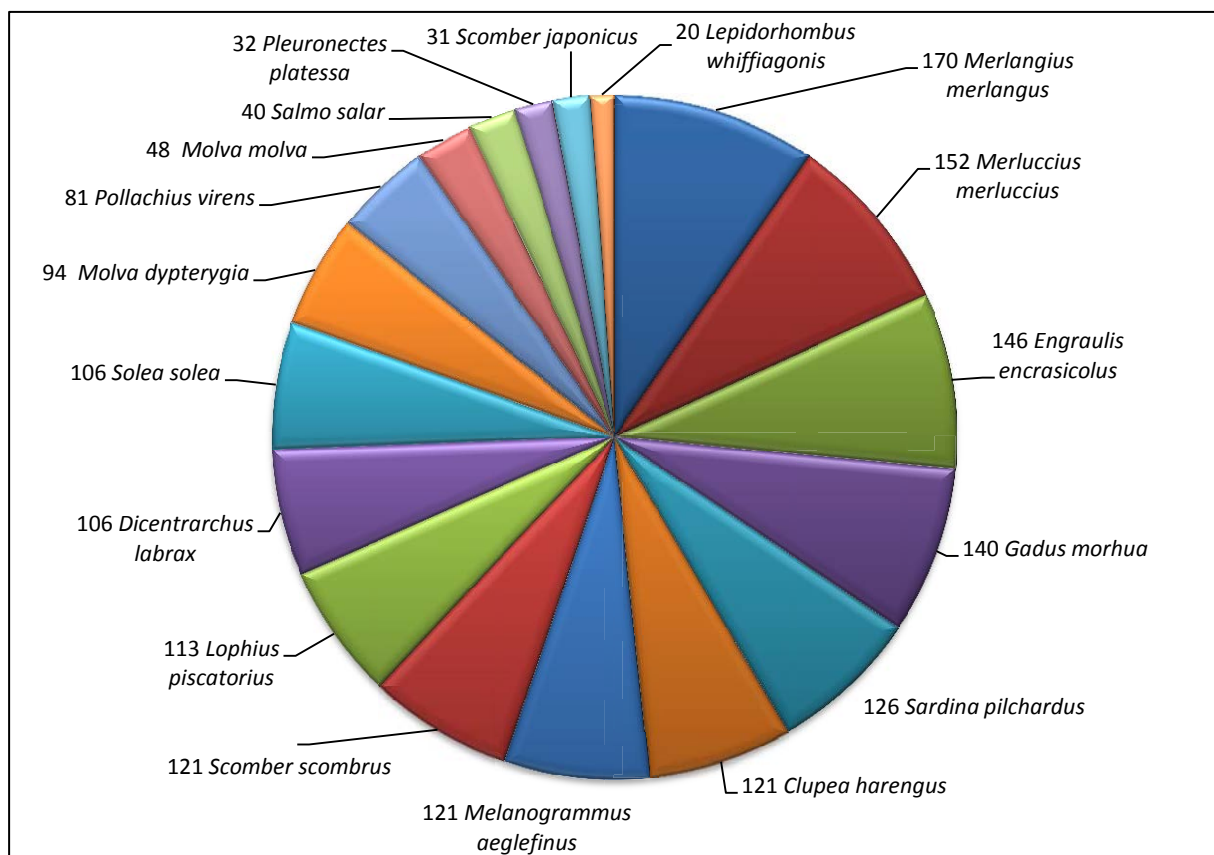


Figure 55 : Effectifs des dix-huit espèces de poisson sélectionnées.

Chaque portion représente la part relative de chaque espèce dans l'effectif global (1768 individus). Les nombres indiqués pour chaque espèce représentent les effectifs.

II.2. Taille des poissons

La taille minimale mesurée parmi les poissons échantillonnés durant l'étude était de 10 cm et correspondait à un anchois (*Engraulis encrasicolus*). Le plus grand poisson mesurait 135 cm et était une lingue franche (*Molva molva*). Les cinq espèces de poissons dont la taille moyenne était la plus grande étaient : la lingue bleue (*Molva dypterygia*), la lingue franche (*Molva molva*), le saumon

Atlantique (*Salmo salar*), la baudroie (*Lophius piscatorius*) et le cabillaud (*Gadus morhua*). La taille moyenne par espèce de poisson était comprise entre 13,08 et 96,89 cm (Figure 56). Il y a une sardine commune et 4 cardines franches dont le poids est inconnu.

La majorité des poissons analysés étaient au-dessus de la taille minimale de capture. Par exemple, la taille minimale de capture du cabillaud est de 42 cm, le hareng de 20 cm et la lingue bleue de 70 cm (Ministre de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, chargé des transports, de la mer et de la pêche, 2015).

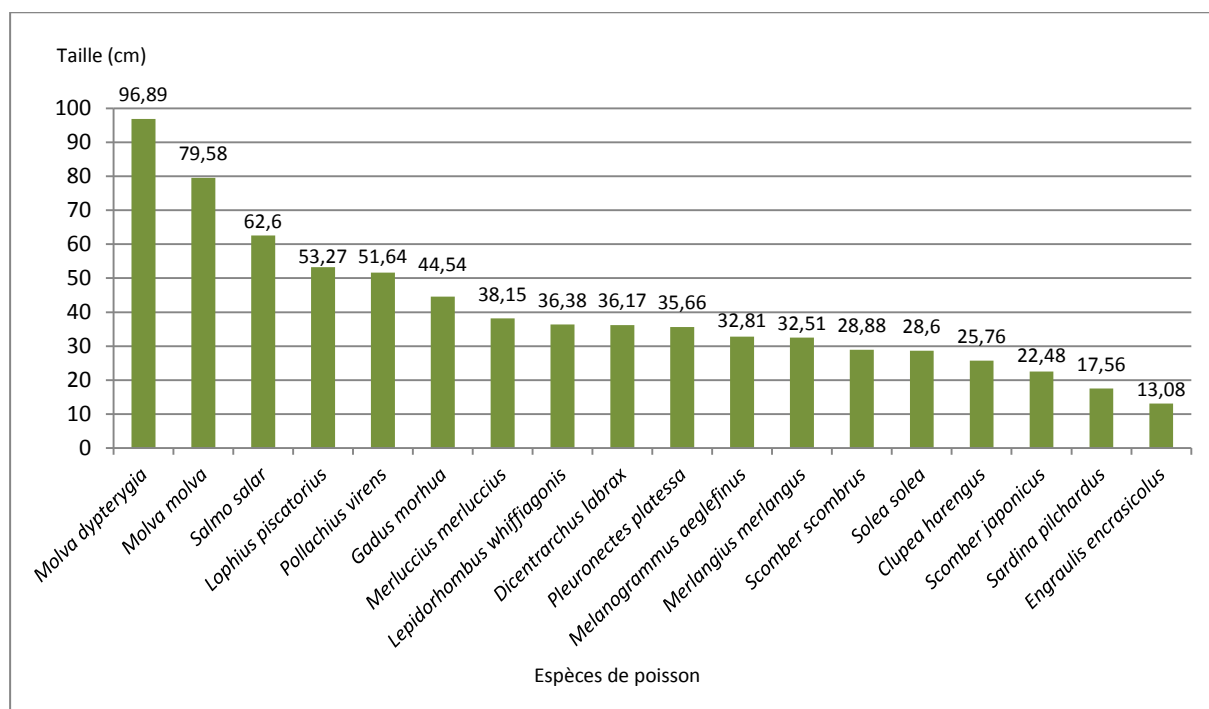


Figure 56 : Taille moyenne des 18 espèces de poissons (1 768 poissons).

II.3. Poids des poissons

Le poids le plus faible retrouvé parmi les poissons échantillonnés était de 5 g et correspondait à un anchois (*Engraulis encrasicolus*) et le poids le plus élevé était de 18 900 g et correspondait à une baudroie (*Lophius piscatorius*). En majorité, les poissons pesaient moins de 1 000 g. Le poids n'a pas été renseigné pour 33 poissons (4 cardines franches : *Lepidorhombus whiffiagonis*, 3 maquereaux communs : *Scomber scombrus*, 7 merlus : *Merluccius merluccius*, 11 anchois : *Engraulis encrasicolus* et 8 sardines : *Sardina pilchardus*). Le poids moyen par espèce de poisson était compris entre 15,33 et 3 675,32 g (Figure 57).

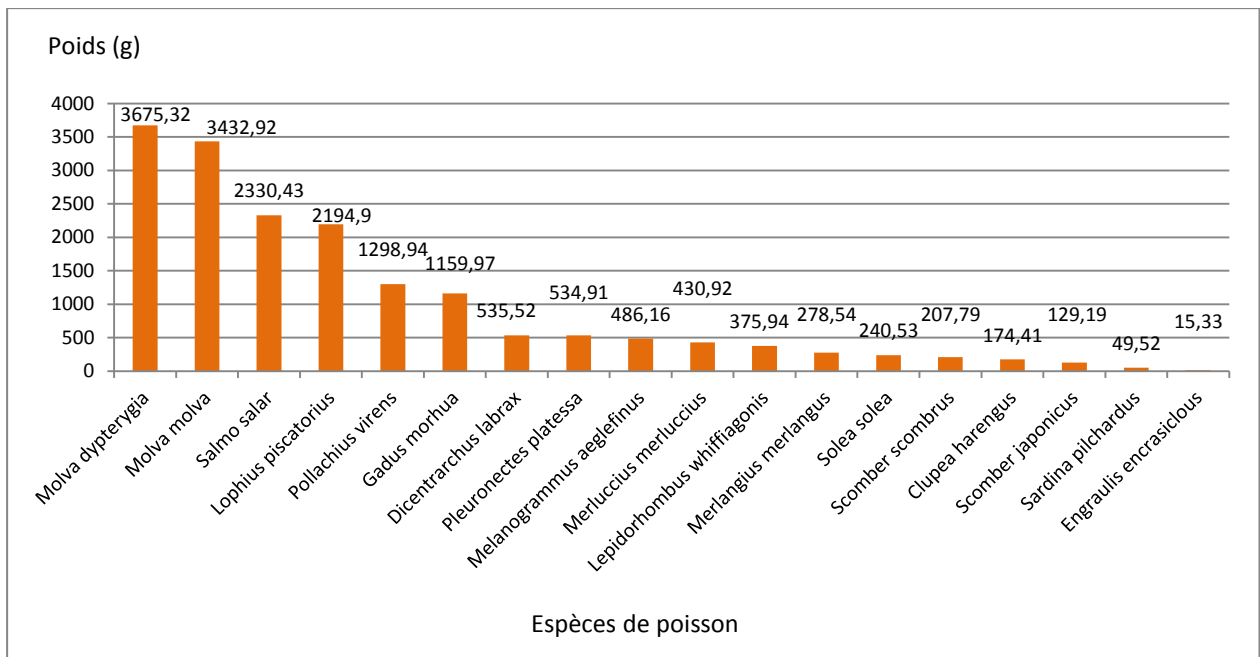


Figure 57 : Poids moyen des 18 espèces de poisson (1 768 poissons).

Il y a 29 poissons dont le poids est inconnu : 11 anchois, 8 sardines communes, 3 maquereaux communs et 7 merlus.

II.4. Sexe des poissons

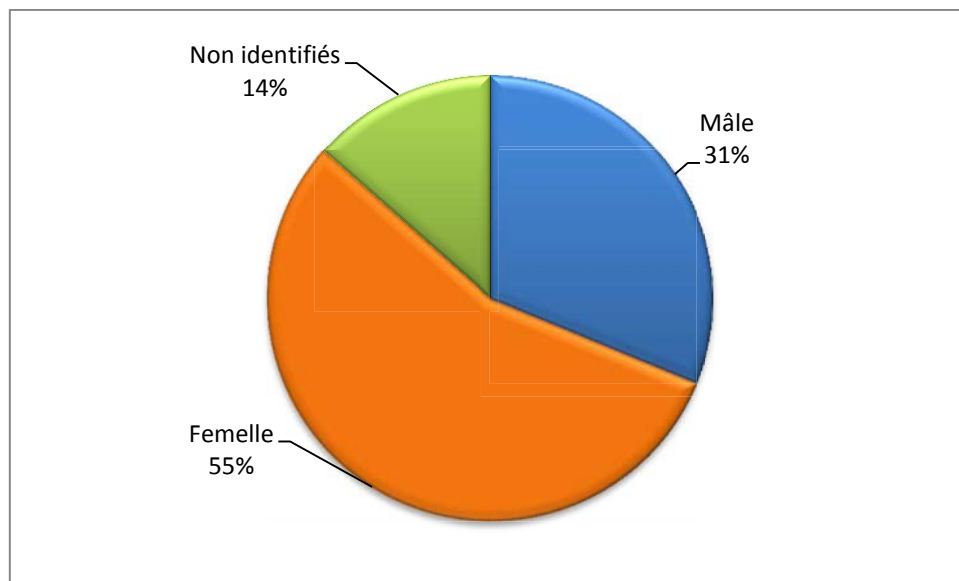


Figure 58 : Sexe des 18 espèces de poisson (1768 poissons).

La plupart des poissons étaient des femelles (978 ou 55 %). Les mâles étaient 552 individus ou 31 % et les poissons dont le sexe n'a pas pu être déterminé à cause de la fraîcheur du poisson, ou du stade du poisson, ou de l'éviscération, étaient 238 individus ou 14 %.

II.5. Type de poisson

Les poissons prélevés ont été répartis en trois types : gras, semi-gras et maigre. Les poissons gras étaient le hareng, le saumon atlantique, la sardine, le maquereau commun et le maquereau espagnol (25 % ou 439 individus). Le poisson semi gras contenait deux espèces, le bar et l’anchois (14 % ou 252 individus). Les autres espèces étaient des poissons maigres représentant plus de 61 % (1077 individus) des échantillons (Figure 59).

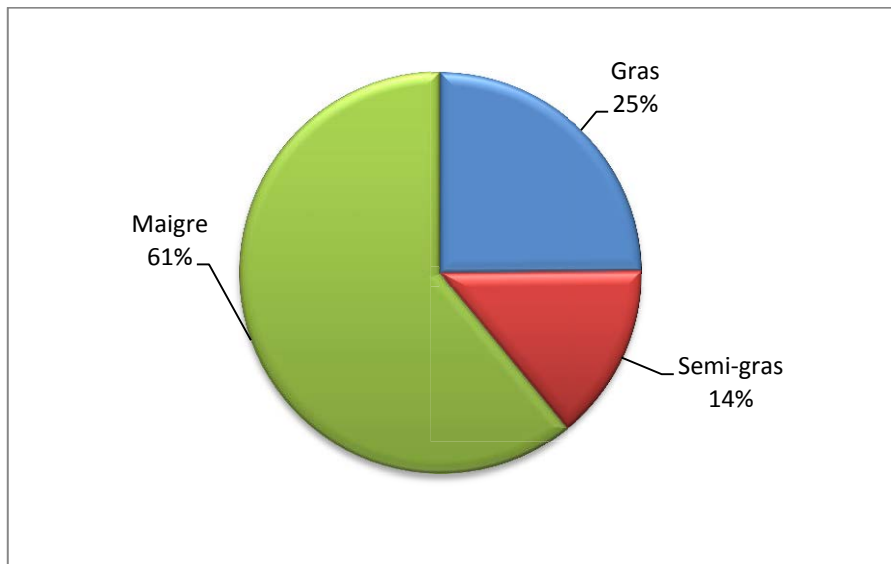


Figure 59 : Pourcentage de type de poisson gras, maigre et semi-gras (1768 poissons)

II.6. Provenance des poissons

Les poissons provenaient de l’aquaculture, d’achats effectués en France ou étaient directement pêchés en mer lors de campagnes scientifiques (Figure 60). Plus de la moitié des poissons provenaient d’achats en France et 45 % provenaient de pêches scientifiques.

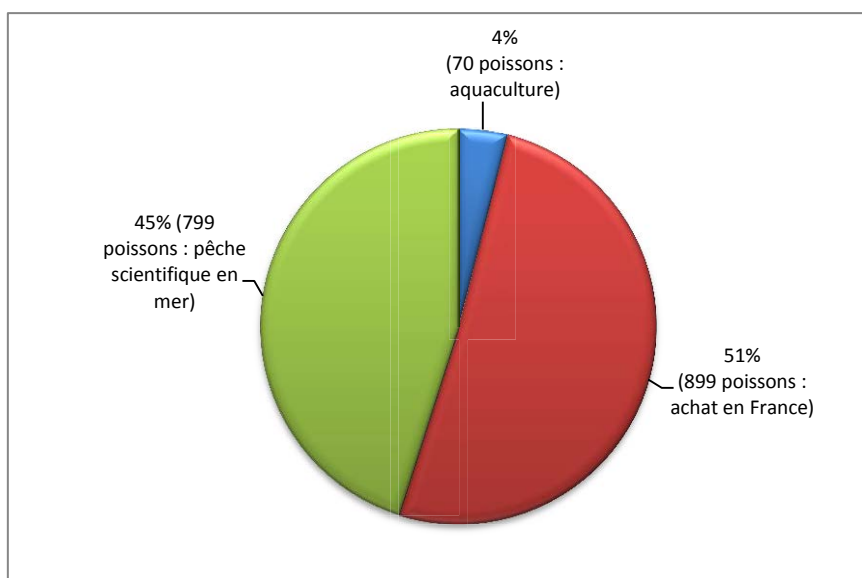


Figure 60 : Répartition des poissons échantillonnés par type : gras, maigre et semi-gras (1 768 poissons)

Les espèces issues de l'aquaculture étaient le saumon Atlantique (*Salmo salar*) et un lot de bar (*Dicentrarchus labrax*).

II.7. Saison de pêche

La saison de pêche a été déterminée en se basant sur le mois pendant lequel les poissons ont été pêchés. Le printemps correspond aux mois d'avril, mai et juin, l'été aux mois de juillet, août et septembre, l'automne aux mois d'octobre, novembre et décembre et l'hiver aux mois de janvier, février et mars. Il y a eu des poissons pêchés en toutes saisons mais un peu moins en hiver. L'anchois (*Engraulis encrasicolus*), la sardine (*Sardina pilchardus*), la lingue bleue (*Molva dypterygia*), la plie (*Pleuronectes platessa*) et le maquereau commun (*Scomber scombrus*) n'ont pas été échantillonnés en automne. Le cabillaud (*Gadus morhua*), le hareng (*Clupea harengus*), l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), la baudroie (*Lophius piscatorius*), la plie (*Pleuronectes platessa*) et la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) n'ont pas été échantillonnés en été. Le merlu (*Merluccius merluccius*), le lieu noir (*Pollachius virens*), la lingue franche (*Molva molva*), le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) et la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) n'ont pas été échantillonnés en hiver. La sole (*Solea solea*), le lieu noir (*Pollachius virens*), le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) et la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) n'ont pas été échantillonnés au printemps et le saumon atlantique n'a été prélevé qu'au printemps (Figure 61).

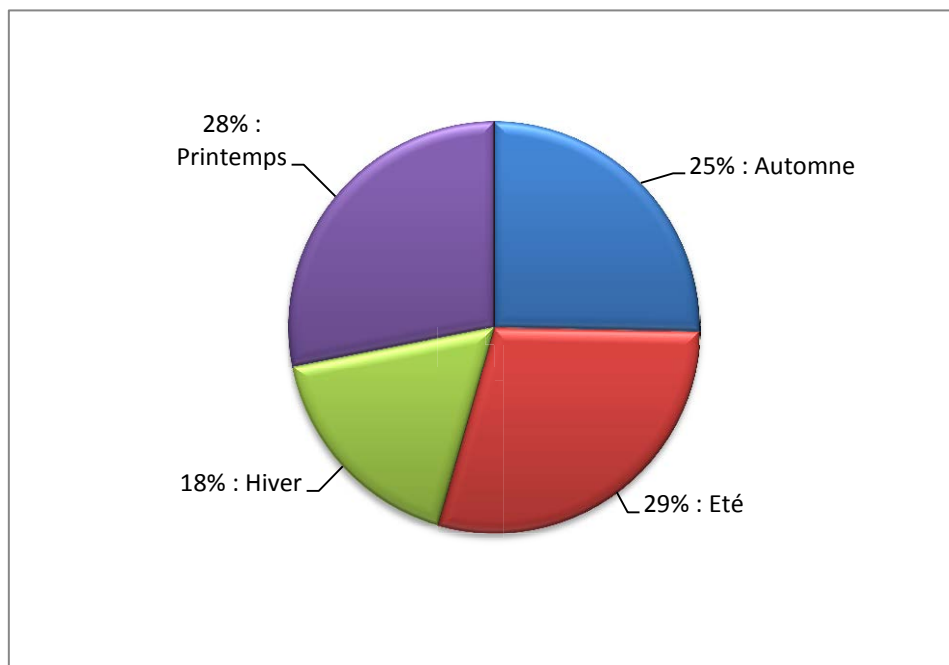
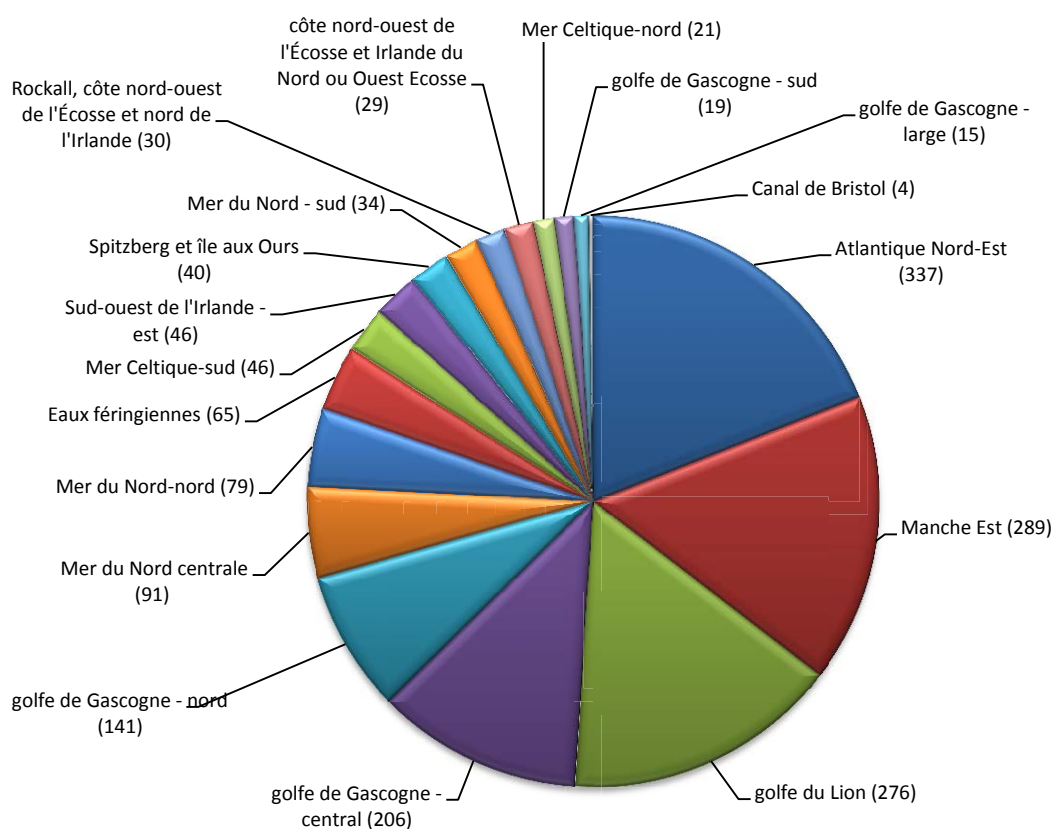


Figure 61 : Répartition (en %) des 1 768 poissons de 18 espèces échantillonnées en fonction des 4 saisons.

II.8. Zones de pêche

Les 1768 poissons des 18 espèces provenaient de 18 zones de pêche : océan Atlantique Nord-Est, Manche-Est, golfe du Lion et golfe de Gascogne (Figure 62). Concernant les 337 poissons provenant de l'océan Atlantique Nord-Est, les coordonnées précises des sous-zones de pêche où ils ont été capturés n'étaient pas connues. Les zones (définies selon la FAO) pour lesquelles la diversité d'espèces de poisson était la plus grande étaient 27 : océan Atlantique Nord-Est (9 espèces de poisson), 27.VII.d : Manche-Est (11 espèces de poisson), 27.VIII.a : golfe de Gascogne - nord (9 espèces de poisson), 27.VII.h : mer Celtique-sud (7 espèces de poisson), 37.1.2 : golfe du Lion (6 espèces de poisson).



Nomenclature des différentes zones de pêche et répartition des différentes espèces échantillonnées : 27 : océan Atlantique Nord-Est (merlan, cabillaud, hareng, baudroie, bar, sole, lingue bleue, lieu noir, lingue franche, 27.II.b : Spitzberg et île aux Ours (saumon atlantique), 27.IV.a : mer du Nord-nord (églefine, lieu noir), 27.IV.b : mer du Nord centrale (merlan, cabillaud, hareng, sole), 27.IV.c : mer du Nord-sud (merlan, cabillaud, hareng, sole), 27.V.b : Eaux féringiennes (lingue bleue), 27.VI : Rockall, côte nord-ouest de l'Écosse et nord de l'Irlande; la côte nord-ouest de l'Écosse et le nord de l'Irlande sont aussi appelés Ouest Ecosse (baudroie) 27.VI.a : côte nord-ouest de l'Écosse et Irlande du Nord ou Ouest Ecosse (lingue franche), 27.VII.d : Manche Est (merlan, anchois, cabillaud, sardine, hareng, églefine, maquereau commun, baudroie, bar, sole, plie), 27.VII.f : Canal de Bristol (églefine, baudroie), 27.VII.g : mer Celtique-nord (merlu, cabillaud, églefine, baudroie, lingue franche), 27.VII.h : mer Celtique-sud (merlan, merlu, cabillaud, églefine, baudroie, lieu noir, cardine franche), 27.VII.j : Sud-ouest de l'Irlande - est (merlu, cabillaud, églefine, baudroie), 27.VIII.a : golfe de Gascogne - nord (merlan, merlu, anchois, cabillaud, sardine, églefine, maquereau commun, baudroie, bar) 27.VIII.b : golfe de Gascogne - central (merlu, églefine, baudroie), 27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud (merlu, anchois), 27.VIII.d : golfe de Gascogne - large (merlu, églefine, baudroie), 37.1.2 : golfe du Lion (merlu, anchois, sardine, maquereau commun, bar, maquereau espagnol)

Figure 62 : Répartition du nombre de poissons échantillonnés dans les différentes zones de pêche (nomenclature FAO).

Répartition des échantillons

- 1 768 poissons de 18 espèces appartenant à 10 familles de poisson échantillonnées dans 18 sous zones de l'océan Atlantique Nord Est (FAO 27) ou de la mer Méditerranée (37).
- Effectif de chaque espèce entre 20 et 170 individus. Parmi les espèces les plus échantillonnées sont retrouvés le merlan, le merlu et l'anchois.
- Près des 2/3 des poissons échantillonnés provenaient de l'océan Atlantique Nord Est (sous-zone indéfinie), de l'Est de la Manche Est, du Golfe du Lion et de la zone centrale du Golfe de Gascogne.
- La plupart des poissons étaient des femelles mais 14 % restent non identifiés.
- La plupart des poissons étaient des poissons maigres, 25 % des poissons gras et 14 % semi-gras.
- La moitié des poissons a été achetée. 45 % provenait de pêches scientifiques en mer et seulement 4 % des poissons de l'aquaculture.
- Au niveau des saisons, la répartition de l'échantillonnage est homogène entre les 4 saisons seul l'hiver est plus faiblement représenté à 18 %.
- Des poissons de plusieurs calibres ont été échantillonnés de 15 g à 4 kg. 6 espèces présentaient un poids moyen supérieur à un kg.

III. Résultats de l'identification moléculaires des nématodes Anisakidae

Les résultats de l'identification des Anisakidae sont présentés en 2 parties : les résultats obtenus par séquençage *Sanger* et ceux obtenus par séquençage *HTS*. A la fin, les résultats des 2 parties sont rassemblées afin d'établir la prévalence, l'intensité, la distribution géographique et l'étude des facteurs influençant la prévalence et l'intensité des Anisakidae dans les poissons. Les résultats des identifications moléculaires par séquençage *Sanger* ou *HTS* et la distribution géographique sont décrits au niveau de l'espèce. En revanche, les données et analyses sur la prévalence, l'intensité parasitaire et la répartition par espèce de poisson et par zone géographique sont décrites au niveau du genre d'Anisakidae.

III.1. Identification des Anisakidae par séquençage *Sanger*

Au total, 6 677 nématodes provenant de 809 poissons ont été identifiés par séquençage *Sanger* au locus *COX2*. Des infections mixtes, c'est-à-dire plusieurs espèces ou genres de parasite retrouvés dans une même localisation corporelle de poisson ont été observées. Les parasites appartenant au genre *Anisakis* infestaient le plus grand nombre de poissons (648 poissons) et c'est le genre qui était présent en plus grand nombre (4 7706 individus) (Tableau XXX).

Tableau XXX : Nombre de poissons et de localisations corporelles des poissons infectés par les différents genres d'Anisakidae et nombre de parasites correspondant identifiés par la méthode de séquençage *Sanger*.

Genres de parasite	Nombre de poissons infectés	Nombre de localisations corporelles infectées	Nombre de parasites
<i>Anisakis</i> spp.	648	1 089	4 706
<i>Contracaecum</i> spp.	87	107	215
<i>Pseudoterranova</i> spp.	57	66	97
<i>Hysterothylacium</i> spp.	319	559	1 542
Nématode non déterminé	44	48	117
total	809	1 870	6 677

III.2. Identification des Anisakidae par séquençage *HTS*

Au total 47 706 Nématodes provenant des 773 localisations corporelles issues de 295 poissons ont été identifiés en *HTS*. *Anisakis* spp. était le genre le plus présent (47 193 individus issus de 438 localisations corporelles et de 294 poissons, Tableau XXXI). Pour des raisons de temps et de budget, seule une partie des échantillons collectés au cours de notre étude ont été analysés. D'un point de vue de la santé publique, les nématodes provenant de la cavité corporelle, du foie et des filets ont été analysés en priorité. Ainsi, la diversité parasitaire des organes tels que l'estomac et l'intestin n'a été que partiellement analysée. Dans le cas où une analyse exhaustive serait effectuée, la proportion des différents genres et espèces d'Anisakidae pourrait donc être modifiée, notamment celle

d'*Hysterothylacium* spp. dont les localisations corporelles préférentielles sont les lumières stomacale et intestinale.

Tableau XXXI : Nombre de poissons et de localisations corporelles des poissons infectés par les différents genres d'Anisakidae et nombre de parasites correspondant identifiés par la méthode HTS.

Genre de parasite	Nombre de poissons infectés	Nombre de localisations corporelles infectées	Nombre de parasites
<i>Anisakis</i> spp.	294	438	47 193
<i>Contracaecum</i> spp.	23	23	24
<i>Pseudoterranova</i> spp.	225	301	471
<i>Hysterothylacium</i> spp.	8	8	13
<i>Phocascaris</i> spp.	1	1	1
Nématode non déterminé	1	1	4
total	295	773	47 706

En termes de qualité de résultat du séquençage HTS, l'Annexe 9 représente le résumé fourni par le séquenceur à l'issue du run de séquençage. Le résumé des caractéristiques des 6 runs de séquençage est présenté dans le Tableau XXXII.

En comparant l'ensemble des critères de séquençage HTS présents dans Tableau XXXII, la qualité des six runs était à la qualité requise (chaque critère atteignant la valeur seuil pour valider chaque run). La quantité d'ADN ajoutée initialement pour l'emPCR était de 26 pmol présentant, au vue du taux de polyclonalité, un ratio correct du nombre de molécules issues de la librairie par billes disponibles. Le nombre de bases total allait de 394,63 à 1 214,39 Mpb. Le nombre de séquences totales pour chaque run était compris entre 1 942 492 et 4 465 567 séquences. Ce nombre de séquences produites a permis de valider les résultats obtenus. Cela signifie que les résultats ont été suffisamment répétés au sein d'un type de parasite séquencé. Les 96 index de chaque run étaient présents. Pour pouvoir estimer la proportion des différentes espèces (ou genres) d'Anisakidae au sein d'une localisation corporelle de poisson, il faut obtenir un minimum de 10 000 séquences en HTS pour un index. La taille moyenne de séquences d'un run était de 179 à 271 pb, avec les séquences les plus longues mesurant de 626 à 636 pb. (Ces valeurs aberrantes pouvant être dues à des séquences chimères). Tous les runs ont eu un résultat de test fragment A (témoin contrôlant le bon démarrage du fonctionnement du séquençage) compris entre 59 et 89 % ce qui était bien supérieur au seuil de 30 % admis. Les puits disponibles étaient en quantité équivalente. De 43 % à 59 % des puits totaux ont été chargés par des billes ISP dont 67 % à 99 % (niveau excellent) d'entre elles étaient des ISP vivants. Le taux d'enrichissement s'étendait de 67 (passable) à 99 %. Cela signifie que parmi les puits chargés, plus de 67 % contenaient des billes ISP vivantes. Le pourcentage de billes polyclonales pour chaque run était compris entre 16 et 19 %, ce qui était inférieur aux 20 % fixés

comme limite critique supérieure. Les dimères d’amorces représentaient moins de 1 %, validant les conditions de purification de ceux-ci. Le nombre de séquences considérées comme bruit de fond était fixé à 5 séquences pour un index. Vingt-quatre à 67 séquences ont été supprimées pour chaque run (Tableau XXXII). Parmi elles, des espèces (Tableau XXXIII) n’étaient pas connues pour être des parasites des poissons comme *Baylisascaris* sp., *Ancylostoma caninum*, *Loa loa*, *Ascaris* sp., *Setaria digitata* etc.

Tableau XXXII : Synthèse des caractéristiques des 6 runs de séquençage HTS

Résumé de séquençage HTS des 6 runs	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	
Quantité d'ADN de librairie pour emPCR (pmol)	26	26	26	26	26	26	
Nombre total de bases (Mpb)	461,18	785,97	394,63	678,71	746,16	1214,39	
Nombre total de reads	2 574 824	3 852 253	1 942 492	2 691 462	3 715 419	4 465 567	
Longueur moyenne des reads (pb) de la sortie du séquençage	179	204	203	252	200	271	
Séquence la plus longue (pb)	626	636	636	632	634	634	
Test fragment TF_A (%)	63%	59%	84%	80%	79%	89%	
Test Fragment ISP	31 417	29 680	56 886	45 977	26 054	59 952	
Total de puits disponibles	11 302	11 303	11 306	11 304	11 304	11 303	
	526	820	353	299	933	686	
Puits avec ISP	nombre	4 894 599	6 664 469	4 078 661	5 280 033	5 968 763	6 686 320
	%	43%	59%	36%	47%	53%	59%
ISP vivants	nombre	3 745 705	5 830 954	2 770 092	4 153 763	5 087 915	6 606 920
	%	77%	87%	68%	79%	85%	99%
Enrichissement	nombre	3 714 288	5 801 274	2 713 206	4 107 786	5 061 861	6 546 968
	%	76%	87%	67%	78%	85%	99%
Polyclonalité	nombre	722 078	909 491	509 857	708 915	918 858	1 117 935
	%	19%	16%	19%	17%	18%	17%
Dimères d'amorce	nombre	40 014	54 699	2 790	34 674	39 834	12 907
	%	1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%
Nombre de reads filtrés (supprimées)	64	45	26	24	67	42	
Présence des 96 index forward et reverse	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	

Tableau XXXIII : Nématodes non-Anisakidae identifiés dans les six runs de séquençage HTS, mais supprimés car présents à raison de 5 séquences ou moins par index.

Autres nématodes		
<i>Ancylostoma caninum</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	<i>Steinernema carpocapsae</i>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Toxocara canis</i>
<i>Ascaris</i> sp.	<i>Cucullanus robustus</i>	<i>Toxocara cati</i>
<i>Baylisascaris ailuri</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Toxascaris leonine</i>
<i>Baylisascaris columnaris</i>	<i>Heliconema longissimum</i>	<i>Toxocara malaysiensis</i>
<i>Brugia malayi</i>	<i>Loa loa</i>	<i>Toxocara</i> sp.
<i>Baylisascaris procyonis</i>	<i>Oesophagostomum dentatum</i>	<i>Toxocara vitulorum</i>
<i>Baylisascaris</i> sp.	<i>Punctodera chalcoensis</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>
<i>Baylisascaris transfuga</i>	<i>Setaria digitata</i>	

Au total 16 espèces d’Anisakidae ont été identifiées (*A. simplex*, *A. paggiae*, *A. pegreffii*, *A. ziphidarum*, *A. typica*, *A. brevispiculata*, *A. physeteris*, *C. osculatum*, *C. rudolphi*, *C. mirounga*,

Phocascaris cystophorae, *P. krabbei*, *P. ceticola*, *H. aduncum* et *H. deardorffoverstreeterorum*) et 2 groupes de séquences dont l'espèce est inconnue (*Anisakis* sp. et *Anisakis* ND). Le groupe *Anisakis* ND est différent de celui nommé *Anisakis* sp. parce qu'il faut vérifier la qualité de ces séquences et si elles sont réellement différentes d'*Anisakis* sp. (Critères définis selon le pourcentage d'identité et la e-value donnés par BLAST), cela veut dire que ce sont des nouvelles séquences.

Le nombre d'Anisakidae identifiés en *HTS* est 7 fois plus nombreux qu'en *Sanger*. Il est donc possible qu'il y ait plus de diversité d'espèces de parasite dans l'analyse *HTS*. Certaines espèces comme *H. reliquens* n'ont été identifiées qu'en *Sanger* bien qu'il s'agisse d'un seul individu ou *Phocascaris cystophorae* identifié uniquement en *HTS* pour un individu. *Anisakis simplex*, espèce dominante en nombre de parasites, a été identifiée dans les trois localisations corporelles de poissons de façon assez similaire en *Sanger* et en *HTS*. *Anisakis pegreffii* a été retrouvé dans les trois localisations corporelles mais en quantités moindres par les deux méthodes. Enfin *H. aduncum* a été identifié en *Sanger* dans les trois localisations corporelles de poissons alors qu'en *HTS* il n'a été identifié que dans la cavité corporelle.

La diversité des Anisakidae détectés par ces deux méthodes n'est pas comparable puisqu'un partage entre les deux techniques a été réalisé : séquençage en *Sanger* s'il y a moins de 11 nématodes et en *HTS* au-delà. Il est donc convenable de trouver moins de diversité dans les nématodes identifiés par *Sanger* qu'en *HTS*.

Pour le résultat de *HTS*, les espèces dont le nombre de séquences était inférieur à 6 ont été éliminées. Les séquences ont été vérifiées et certaines parmi elles étaient caractérisées comme appartenant à des séquences d'ADN de parasite spécifique d'autres animaux que le poisson. Dans l'identification en *HTS*, il existe également les espèces d'Anisakidae dont l'espèce n'a pas été déterminée (ND). Pour les espèces non-déterminées issues du séquençage *Sanger*, il s'agit de séquences de mauvaise qualité ou d'un problème de la *PCR*. En *HTS*, un problème de réalisation de la *PCR* de librairie en amont du séquençage *HTS* peut expliquer l'absence de détermination. Si le nombre de séquences d'un index était inférieur à 10 000 ou que la quantité d'ADN était basse, l'échantillon n'a pas été inclus dans l'étude. Les séquences du genre ou de l'espèce d'Anisakidae non déterminés en *HTS* (*Anisakis*) sont des séquences ne correspondant à aucun genre d'Anisakidae lors de la réalisation du BLAST local. Il est également possible qu'il s'agisse de nouvelles séquences variantes de parasites. Cette hypothèse reste à confirmer.

Les deux méthodes utilisées pendant cette étude ont chacune leurs limites. Le séquençage *Sanger* est une méthode où les échantillons sont analysés individuellement : l'extraction d'ADN, la *PCR* puis le séquençage sont réalisés séparément pour chaque échantillon. L'analyse est réalisée grâce à un

logiciel de bioinformatique pour la vérification des séquences et la constitution d'une séquence consensus avant de les comparer individuellement aux séquences disponibles dans la base de séquences sur BLAST NCBI. Le temps d'analyse peut donc être long selon la quantité de vers présents dans une localisation corporelle. Dans cette étude, au total 6 677 séquences produites par séquençage *Sanger* ont été traitées de cette façon durant 3 ans. De plus, le prix de revient par base est élevé si cette méthode est utilisée (Schadt *et al.*, 2010). Concernant le *HTS*, la plateforme PGM™ Ion Torrent reste la plateforme dont le coût de séquençage reste abordable parmi les technologies NGS pour ce type d'application (Glenn, 2011 ; Whiteley *et al.*, 2012). Le développement de cette méthode a duré 6 mois et durant ces 3 années, elle a permis de traiter 19 242 017 séquences en 6 runs (x 96 index) provenant de 773 localisations corporelles de 295 poissons. Le coût par base est basse puisque la technologie mise en place permet de séquencer de nombreux échantillons parallélisés sur une puce. Cette approche n'a évidemment d'intérêt que pour des échantillons présentant une grande nombre d'individu (supérieure à 11 nématodes) par échantillon dû au coût des consommables (prix de la puce de séquençage, prix du kit) (Schadt *et al.*, 2010).

Tableau XXXIV : Calcul du prix de revient pour les 2 méthodes de séquençage utilisées : méthode *Sanger* et *HTS*.

Séquençage <i>Sanger</i>					Séquençage <i>HTS</i>			
Etapes	1 individu	440 individus	14867 individus	Temps utilisé	Etapes	440 individus	14867 individus	Temps utilisé
extraction d'ADN individuelle(€)	1,125	495	16725	10 jours	extraction d'ADN en pool (€)	456,64	1515,12	10 à 15 jours
prix du séquençage (€)	2,6	1144	38654,2	337 jours	prix du séquençage par plaque 96 échantillons (€)	1300	2815,12	
prix total	3,725	1639	55379,2		prix total	1356,64	4330,24	

Le Tableau XXXIV compare les capacités et les prix de revient des techniques *HTS* et *Sanger*. Il est constaté qu'en *HTS*, pour une plaque de 96 échantillons, le temps d'identification reste le même, le prix diminue quand le nombre de parasites augmente car le nombre de puits reste le même mais un puits peut contenir les ADN d'un grand nombre d'espèces issues d'un grand nombre de parasites. Pour le séquençage par la méthode *Sanger*, plus le nombre de parasites augmente car ici un parasite est égal à un échantillon, plus le temps et le prix augmentent. Pour le *HTS*, même avec une augmentation importante du nombre de parasites, le prix de revient reste stable car l'ADN est extrait en mélange à partir de plusieurs centaines de nématodes provenant d'une localisation corporelle (= un échantillon) et que le coût du séquençage est globalement fixe pour un *run*. A prix équivalent, le *HTS* a permis d'identifier un plus grand nombre de nématodes en moins de temps par rapport à la méthode *Sanger*.

Dans notre étude, le nombre de parasites déjà identifiés par *HTS* pour une localisation corporelle de poisson a été de 11 nématodes minimum à 2 500 nématodes maximum. Ainsi, théoriquement, sur une puce 318 pouvant contenir 96 échantillons (correspondant aux 96 localisations corporelles), on

peut identifier au minimum 1 056 nématodes et au maximum 240 000 nématodes au cours d'un seul *run* en utilisant toujours le même temps d'identification (10 à 15 jours) sur la plateforme PGM™ Ion Torrent.

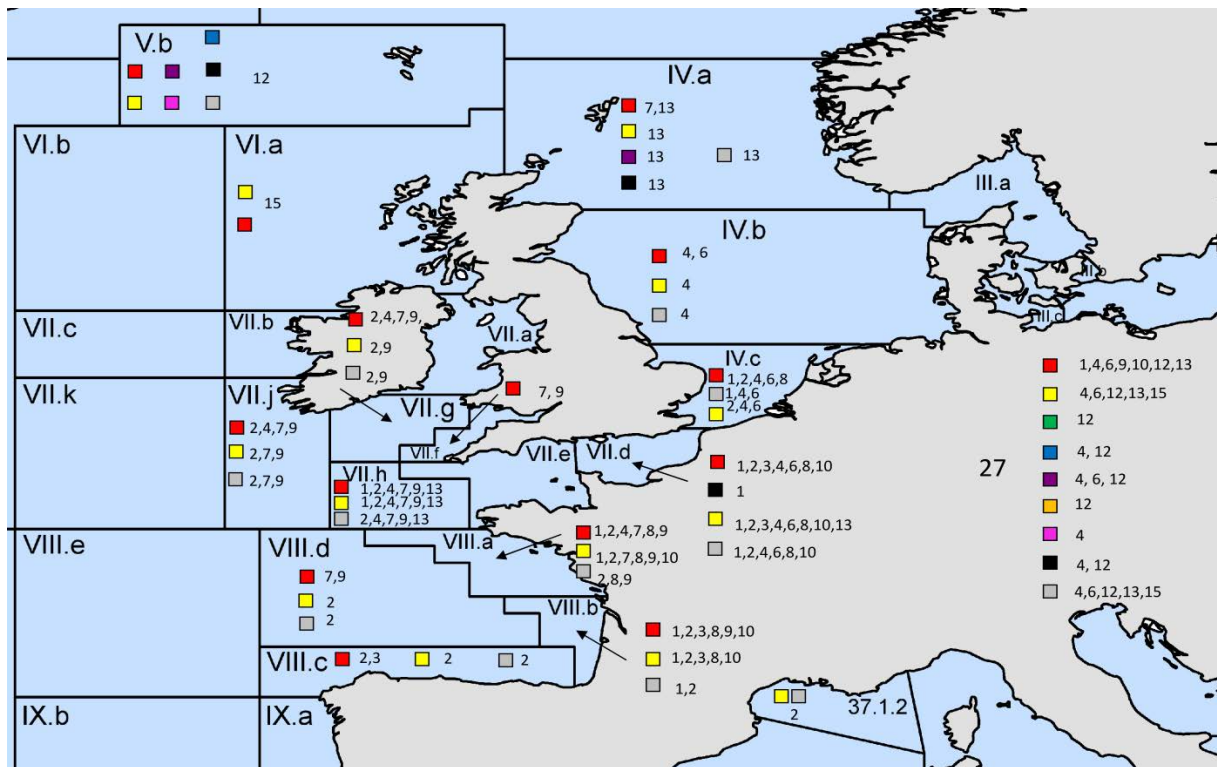
III.3. Distribution des Anisakidae dans les seize espèces de poisson infectées selon différentes zones géographiques

Au total, 18 espèces d'Anisakidae ont été observées parmi les 16 espèces de poisson les plus consommées en France échantillonnées dans l'océan Atlantique Nord-Est (zone majeure 27) et la mer Méditerranée (zone majeure 37). Les quatre cartes de répartition des Anisakidae, construites grâce aux données accumulées au cours de notre étude (Figure 63 à Figure 66), peuvent être comparées avec la carte de répartition des Anisakidae publiée par Mattiucci *et al.*, (2008) reprise dans la partie II.2. Parmi toutes les zones de pêche, seule la zone 27.II.b Spitzberg et île aux Ours n'est pas une zone où l'on a observé des poissons infectés par les larves de nématodes Anisakidae. Cependant, les seuls poissons analysés provenant de cette zone étaient des saumons atlantiques d'élevage. Pour certains lots de poisson, bien que la zone de pêche ait été renseignée, aucune information n'est disponible concernant la sous zone (cela reste océan Atlantique Nord-Est comme zone renseignée), cela rend la comparaison de données difficile.

III.3.1. Distribution géographique des espèces du genre Anisakis

La Figure 63 récapitule la répartition géographique des neuf espèces appartenant au genre *Anisakis* et *Anisakis* ND (dont l'espèce n'a pas été identifiée) dans les deux grandes zones de pêche FAO 27 et 37. Les espèces de poisson sont représentées par un chiffre. Une espèce de poisson peut avoir été prélevée dans différentes zones de pêche. Il y a des lots de poisson dont la sous-zone de pêche n'était pas précisée et ces lots de poissons sont présentés à droite de la carte.

Les espèces *A. simplex* (carré rouge, Figure 63) et *A. pegreffii* (carré jaune, Figure 63) étaient présentes dans la plupart des zones géographiques échantillonnées. L'espèce *A. simplex* était présente dans toutes les zones et dans toutes les espèces de poisson échantillonnées sauf chez le lieu noir provenant de la zone 27.VII.d Manche Est, chez le bar provenant de la zone 27.VIII.a golfe de Gascogne-nord et chez les poissons échantillonnés dans la zone 37 mer Méditerranée et mer Noire (merlu, anchois, sardine, maquereau commun, bar et maquereau espagnol). Cette espèce est connue comme parasitant les poissons benthiques et démersaux (Abollo *et al.*, 2001) mais elle parasite également des espèces pélagiques comme le chinchard à queue jaune (*Trachurus trachurus*) (Mattiucci *et al.*, 1997). La limite sud d'*A. simplex* est le détroit de Gibraltar et il est trouvé occasionnellement en mer Méditerranée (Mattiucci *et al.*, 2007 ; Mattiucci *et al.*, 2004). Le résultat de notre étude est donc en concordance avec les résultats précédemment obtenus.



■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■
A. simplex *A. pegreffii* *A. brevispiculata* *A. paggiae* *A. physeteris* *A. typica* *A. ziphidarum* *Anisakis* sp. *Anisakis* ND

Un numéro correspond à une espèce de poisson 1 : merlan (*Merlangius merlangus*), 2 : merlu (*Merluccius merluccius*), 3 : anchois (*Engraulis encrasicolus*), 4 : cabillaud (*Gadus morhua*), 5 : sardine (*Sardina pilchardus*), 6 : hareng (*Clupea harengus*), 7 : églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), 8 : maquereau commun (*Scomber scombrus*), 9 : baudroie (*Lophius piscatorius*), 10 : bar (*Dicentrarchus labrax*), 11 : sole (*Sole solea*), 12 : lingue bleue (*Molva dypterygia*), 13 : lieu noir (*Pollachius virens*), 14 : saumon atlantique (*Salmo salar*), 15 : lingue franche (*Molva molva*), 16 : cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), 17 : maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) et 18 plie (*Pleuronectes platessa*).

Les espèces de poisson prélevées dans différentes zones, 27 : océan Atlantique Nord-Est (1, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15), **27.II.b : Spitzberg et île aux Ours** (14), **27.IV.a : mer du Nord-nord** (7, 13), **27.IV.b : mer du Nord centrale** (1, 4, 6, 11), **27.IV.c : mer du Nord-sud** (1, 2, 4, 6, 8), **27.V.b : eaux Féringiennes** (12), **27.VI : Rockall, côte nord-ouest de l'Écosse et nord de l'Irlande**; la côte nord-ouest de l'Écosse et le nord de l'Irlande sont aussi appelés **Ouest Ecosse** (9), **27.VI.a : côte nord-ouest de l'Écosse et Irlande du Nord ou Ouest Ecosse** (15), **27.VII.d : Manche Est** (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 18), **27.VII.f : Canal de Bristol** (7, 9), **27.VII.g : mer Celtique-nord** (2, 4, 7, 9, 15), **27.VII.h : mer Celtique-sud** (1, 2, 4, 7, 9, 13, 16), **27.VII.j : Sud-ouest de l'Irlande - est** (2, 4, 7, 9), **27.VIII.a : golfe de Gascogne - nord** (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10), **27.VIII.b : golfe de Gascogne - central** (1,2,3,5,8, 9,10), **27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud** (2, 3), **27.VIII.d : golfe de Gascogne - large** (2, 7, 9), **37.1.2 : golfe du Lion** (2, 3, 5, 8, 10, 17)

Figure 63 : Distribution des espèces appartenant au genre *Anisakis* dans les 16 espèces de poisson provenant des zones de pêche FAO 27 océan Atlantique Nord-Est et 37 mer Méditerranée - mer noire. Les zones où aucun poisson infecté n'a été trouvé ne sont pas affichées.

Anisakis pegreffii était présent dans toutes les zones géographiques sauf la sous-zone 27.VII.f canal de Bristol. Cette espèce n'a pas été observée chez l'églefin provenant de la sous-zone IV.a mer du Nord-Nord, ni chez le hareng provenant de la zone IV.b mer du Nord-centrale, ni chez le cabillaud ou l'églefin provenant de la zone VII.j Sud-Ouest de l'Irlande-Est, ni chez le maquereau espagnol de la sous zone VII.h mer Celtique-sud, ni chez l'églefin et la baudroie de la sous-zone VIII.d golfe de Gascogne au large et ni chez l'anchois de la sous zone VIII.c golfe de Gascogne-sud. Par contre, cette espèce a été identifiée dans le golfe du Lion 37.1.2 et elle a été la seule espèce identifiée en mer

Méditerranée chez le merlu. Selon Mattiucci *et al.* (2004), c'est une zone dans laquelle le dauphin à gros nez (*Tursiops truncatus*), hôte définitif de cette espèce est largement présent. En 2008, Mattiucci *et al.* ont défini la limite Nord de la répartition d'*A. pegreffii* au niveau de la péninsule Ibérique (Abollo *et al.*, 2001 ; Marques *et al.*, 2006 ; Mattiucci et Nascetti, 2008 ; Mattiucci *et al.*, 1997 ; Pontes *et al.*, 2005). Mais dans notre étude, nous avons observé qu'*A. pegreffii* infectait les poissons de toutes les sous-zones du golfe du Lion et de la façade Atlantique jusqu'aux eaux Féringiennes. Notre étude est la première à montrer la présence d'*A. pegreffii* dans les zones 27.IV.a mer du Nord-Nord chez le lieu noir, 27.IV.b mer du Nord centrale chez le cabillaud, 27.IV.c mer du Nord-Sud chez le merlu, le cabillaud et le hareng, 27.V.b eaux Féringiennes chez la lingue bleue, 27.VII.d Manche Est chez le merlan, le merlu, l'anchois le cabillaud, le hareng, le maquereau commun, la sole et le lieu noir, 27.VII.g mer Celtique-Nord chez le merlu et la baudroie, 27.VII.h mer Celtique-Sud chez le merlan, le merlu, le cabillaud, l'églefin, la baudroie et le lieu noir, et enfin 27.VII.j Sud-Ouest de l'Irlande – Est chez le merlu, l'églefin et la baudroie.

Anisakis brevispiculata n'a été observé que dans la lingue bleue provenant de la zone 27 océan Atlantique Nord-Est. La limite Nord de cette espèce est située dans la zone 27.VIII.c golfe de Gascogne – sud. La limite Sud est localisée dans l'océan Atlantique Sud autour de la mer d'Argentine. Il est dommage que la sous-zone de ce lot de lingues bleues n'ait pas été indiquée dans notre étude.

Anisakis paggiae n'a été observé que dans la sous-zone 27.V.b eaux Féringiennes chez la lingue bleue et la zone majeure de l'océan Atlantique Nord-Est dans le cabillaud (*Gadus morhua*). Ces résultats sont les premiers concernant les lingues dans les eaux Féringiennes.

Anisakis physeteris a été identifiée chez la lingue bleue pêchée dans les eaux Féringiennes et chez le lieu noir pêché au Nord de la mer du Nord. Cette espèce n'avait été précédemment identifiée qu'en mer Méditerranée par Mattiucci *et al.* (1986a).

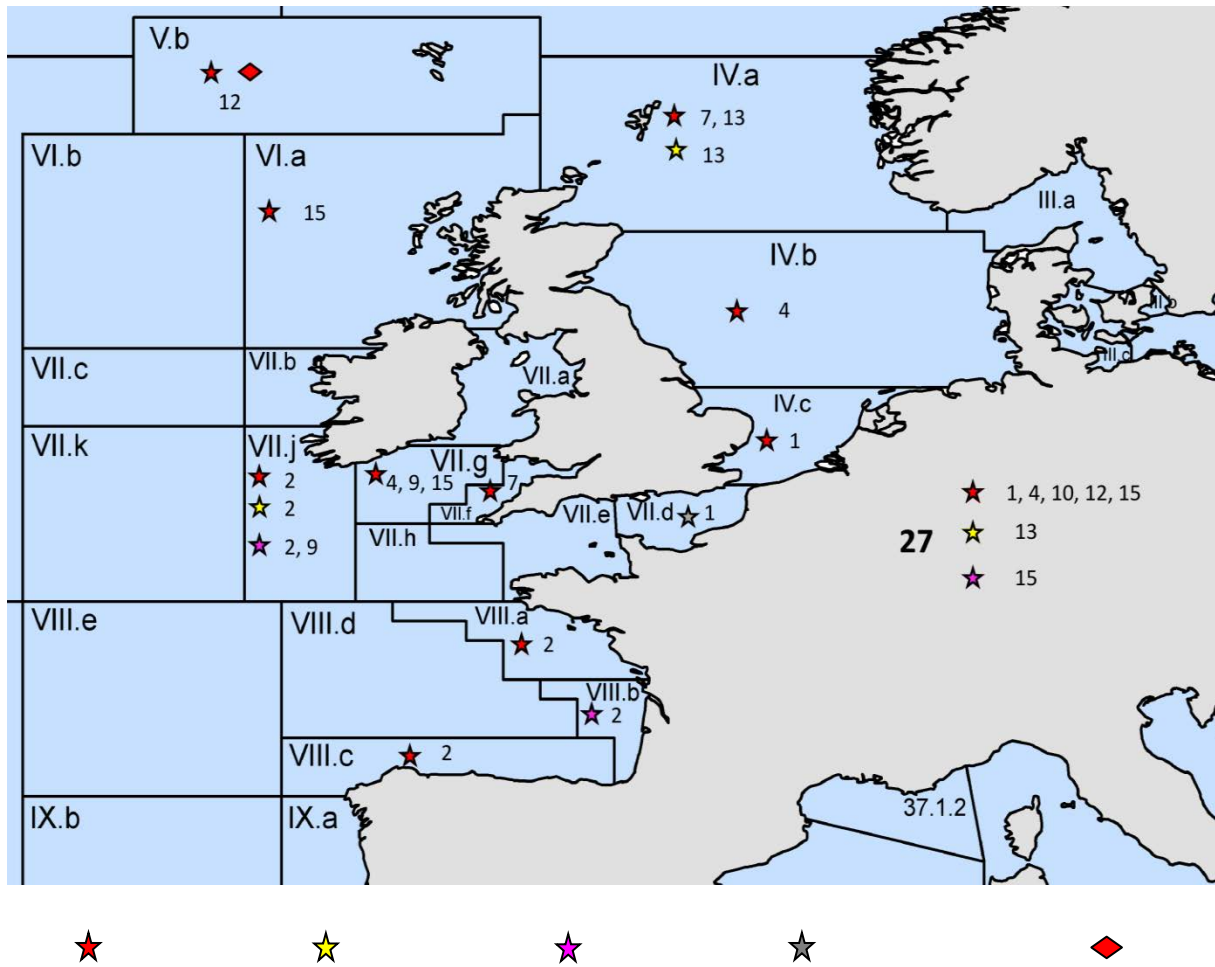
Anisakis typica infestait la lingue bleue provenant de l'océan Atlantique Nord-Est dans notre étude. Il est également décrit par Mattiucci en 2004 comme parasite infectant le merlu dans la même zone de pêche.

Anisakis ziphidarum a été observé dans la lingue bleue dans les eaux Féringiennes et dans le cabillaud de l'océan Atlantique Nord-Est. Ce sont des nouveaux hôtes paraténiques identifiés pour cette espèce. Cette espèce a été identifiée dans la littérature chez le merlu (*Merluccius merluccius*) (Mattiucci *et al.*, 2004) et le sabre noir (*Aphanopus carbo*) (Pontes *et al.*, 2005) dans l'océan Atlantique. Notre étude met en évidence, pour la première fois, l'espèce *A. ziphidarum* chez la lingue bleue dans l'océan Atlantique Nord-Est.

Des parasites appartenant au genre *Anisakis* mais dont l'espèce n'a pas pu être déterminée (notés *Anisakis* sp.) ont été identifiés chez la lingue bleue des eaux Féringiennes, le lieu noir du Nord de la mer du Nord, le merlan de Manche- Est, le cabillaud et la lingue bleue de l'océan Atlantique Nord-Est. Dans presque toutes les sous zones géographiques, des vers *Anisakis* dont l'espèce est inconnue étaient présents. Ces séquences obtenues peuvent correspondre à de nouvelles espèces. Toutes les espèces de poisson prélevées dans ces différentes sous-zones n'étaient pas toutes infectées par *Anisakis* spp. : c'est le cas pour les zones de la mer du Nord centrale (merlan et sole), 27.VI Rockall, côte Nord-Ouest de l'Écosse et Nord de l'Irlande, la côte Nord-Ouest de l'Écosse et le Nord de l'Irlande ou Ouest Ecosse (baudroie), 27.VII.d Manche Est (sardine, églefin, baudroie, sole et plie), mer du Nord centrale (merlan et sole), 27.VII.g mer Celtique Nord (lingue franche), 27.VIII.a golfe de Gascogne-Nord (anchois et sardine), et 37.1.2 golfe de Lion (anchois, sardine, maquereau commun, bar et maquereau espagnol).

La diversité des espèces d'*Anisakis* dans des eaux féringiennes montre également la sympatrie entre plusieurs espèces dans cette zone dans laquelle sept espèces différentes d'*Anisakis* ont été observées au cours de notre étude.

III.3.2. *Distribution géographique des espèces du genre Contracaecum et Phocascaris*



★ *C. osculatum s.s.*
 ★ *C. rudolphi*
 ★ *C. mirounga*
 ★ *Contracaecum ND*
 ◆ *Phocascaris cystophorae*

Un numéro correspond à une espèce de poisson 1 : merlan (*Merlangius merlangus*), 2 : merlu (*Merluccius merluccius*), 3 : anchois (*Engraulis encrasicolus*), 4 : cabillaud (*Gadus morhua*), 5 : sardine (*Sardina pilchardus*), 6 : hareng (*Clupea harengus*), 7 : églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), 8 : maquereau commun (*Scomber scombrus*), 9 : baudroie (*Lophius piscatorius*), 10 : bar (*Dicentrarchus labrax*), 11 : sole (*Sole solea*), 12 : langue bleue (*Molva dypterygia*), 13 : lieu noir (*Pollachius virens*), 14 : saumon atlantique (*Salmo salar*), 15 : lingue franche (*Molva molva*), 16 : cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), 17 : maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) et 18 plie (*Pleuronectes platessa*).

Les espèces de poisson prélevées dans différentes zones, 27 : Atlantique Nord-Est (1, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15), **27.II.b : Spitzberg et île aux Ours** (14), **27.IV.a : mer du Nord-nord** (7, 13), **27.IV.b : mer du Nord centrale** (1, 4, 6, 11), **27.IV.c : mer du Nord-sud** (1, 2, 4, 6, 8), **27.V.b : eaux Féringiennes** (12), **27.VI : Rockall, côte nord-ouest de l'Écosse et nord de l'Irlande; la côte nord-ouest de l'Écosse et le nord de l'Irlande sont aussi appelés Ouest Ecosse** (9), **27.VI.a : côte nord-ouest de l'Écosse et Irlande du Nord ou Ouest Ecosse** (15), **27.VII.d : Manche Est** (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 18), **27.VII.f : Canal de Bristol** (7, 9), **27.VII.g : mer Celtique-nord** (2, 4, 7, 9, 15), **27.VII.h : mer Celtique-sud** (1, 2, 4, 7, 9, 13, 16), **27.VII.j : Sud-ouest de l'Irlande - est** (2, 4, 7, 9), **27.VIII.a : golfe de Gascogne - nord** (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10), **27.VIII.b : golfe de Gascogne - central** (1,2,3,5,8, 9,10), **27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud** (2, 3), **27.VIII.d : golfe de Gascogne - large** (2, 7, 9), **37.1.2 : golfe du Lion** (2, 3, 5, 8, 10, 17)

Figure 64 : Distribution des espèces appartenant aux genres *Contracaecum* et *Phocascaris* dans seize espèces de poisson provenant des zones de pêche FAO 27 océan Atlantique Nord-Est et 37 mer Méditerranée - mer Noire.

La Figure 64 montre que par rapport au genre *Anisakis*, *Contracaecum* et *Phocascaris* présentaient des taux de prévalence et d'intensité de parasitisme moindres. Trois espèces appartenant au genre *Contracaecum* ont été identifiées (*C. osculatum s.s.*, *C. rudolphii*, *C. mirounga*)

et une appartenant au genre *Phocascaris* : *P. cystophorae*. Des individus pour lesquels seul le genre a pu être défini ont également été observés : *Contracaecum* ND.

L'espèce *C. osculatum* infectait des poissons distribués dans onze sous-zones de pêche des eaux Féringiennes jusqu'au Sud du golfe de Gascogne. Elle était présente dans les deux lots de merlu provenant de deux sous-zones du golfe de Gascogne (Nord et au large). Cette espèce infectait aussi le merlan de la sous-zone IV.c mer du Nord-Sud et le merlu provenant des sous-zones 27.VII.j Sud-Ouest de l'Irlande – Est, 27.VIII.a golfe de Gascogne – Nord et 27.VIII.c golfe de Gascogne – Sud. *Contracaecum osculatum* a été rapportée chez deux espèces de poisson dont la première est le hareng de l'Atlantique Nord-Est (mer de Barents) (Szostakowska *et al.*, 2005) et le cabillaud du golfe du Saint-Laurent (Atlantique Nord-Ouest) (McClelland et Marcogliese, 1994). Dans notre étude, nous avons montré que *C. osculatum* infectait également le cabillaud en mer du Nord et mer Celtique-Nord.

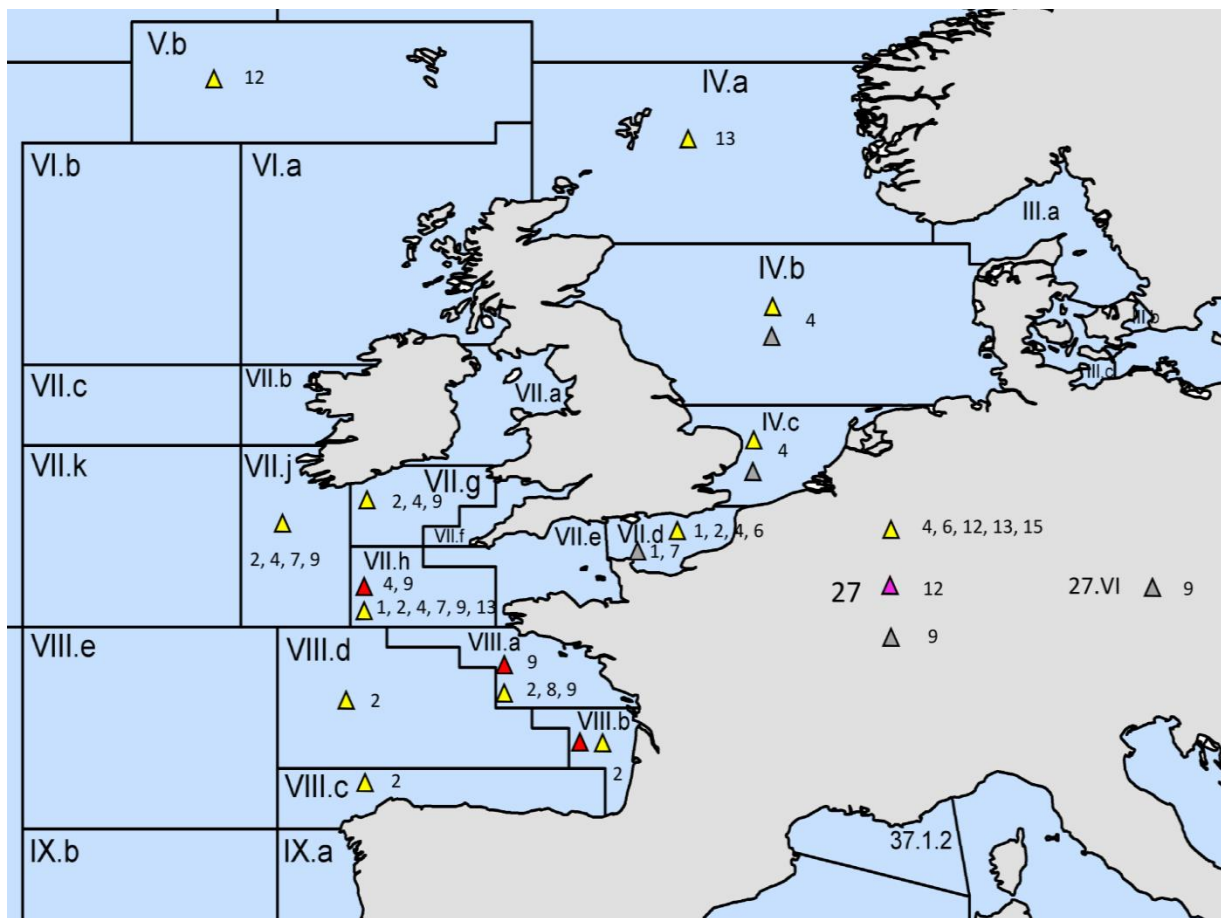
Contracaecum rudolphii a été identifié chez le merlu du Sud-ouest de l'Irlande-est, chez le lieu noir du nord de la mer du Nord et chez le lieu noir de l'Atlantique Nord-est. Cette espèce est cosmopolite selon la littérature, identifiée chez les oiseaux marins. Elle infecte des oiseaux marins comme les cormorans (Kanarek et Bohdanowicz, 2009). L'espèce de poisson dans laquelle cette espèce a été rapportée est la truite (*Salmo trutta*) de la rivière Valdivia au Chili (Torres et Cubillos, 1987).

Contracaecum mirounga a été identifié chez le merlu et la baudroie du Sud-ouest de l'Irlande-est, chez le merlu du golfe de Gascogne-centrale et chez la lingue franche de l'Atlantique Nord-Est. Aucune étude n'a rapporté l'infestation de *C. mirounga* chez les poissons. A ce jour, seul l'hôte définitif, le phoque (*Mirounga leonina*) avait été décrit (Mattiucci et Nascetti, 2008).

Des individus du genre *Contracaecum* dont l'espèce reste non identifiée étaient présents chez le merlan pêché en Manche Est. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour conclure quant à la suspicion d'une nouvelle espèce (vérification de la qualité des séquences, construction d'arbres phylogénétiques).

L'espèce *Phocascaris cystophorae* a été identifiée chez la lingue bleue dans les eaux Féringiennes. Aucune étude ne montre sa présence chez les poissons mais chez le phoque à capuchon (*Cystophora cristata*) (Abollo et Pascual, 2002). Nous décrivons donc ici la présence de cette espèce chez la lingue bleue pour la première fois.

III.3.3. *Distribution géographique des espèces du genre Pseudoterranova*



P. decipiens



P. krabbei



P. ceticola



Pseudoterranova ND

Un numéro correspond à une espèce de poisson 1 : merlan (*Merlangius merlangus*), 2 : merlu (*Merluccius merluccius*), 3 : anchois (*Engraulis encrasicolus*), 4 : cabillaud (*Gadus morhua*), 5 : sardine (*Sardina pilchardus*), 6 : hareng (*Clupea harengus*), 7 : églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), 8 : maquereau commun (*Scomber scombrus*), 9 : baudroie (*Lophius piscatorius*), 10 : bar (*Dicentrarchus labrax*), 11 : sole (*Sole solea*), 12 : lingue bleue (*Molva dypterygia*), 13 : lieu noir (*Pollachius virens*), 14 : saumon atlantique (*Salmo salar*), 15 : lingue franche (*Molva molva*), 16 : cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), 17 : maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) et 18 plie (*Pleuronectes platessa*).

Les espèces de poisson prélevées dans différentes zones, 27 : Atlantique Nord-Est (1, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15), 27.II.b : Spitzberg et île aux Ours (14), 27.IV.a : mer du Nord-nord (7, 13), 27.IV.b : mer du Nord centrale (1, 4, 6, 11), 27.IV.c : mer du Nord-sud (1, 2, 4, 6, 8), 27.V.b : eaux Féringiennes (12), 27.VI : Rockall, côte nord-ouest de l'Écosse et nord de l'Irlande; la côte nord-ouest de l'Écosse et Irlande du Nord ou Ouest Écosse (9), 27.VI.a : côte nord-ouest de l'Écosse et Irlande du Nord ou Ouest Écosse (15), 27.VII.d : Manche Est (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 18), 27.VII.f : Canal de Bristol (7, 9), 27.VII.g : mer Celtique-nord (2, 4, 7, 9, 15), 27.VII.h : mer Celtique-sud (1, 2, 4, 7, 9, 13, 16), 27.VII.j : Sud-ouest de l'Irlande - est (2, 4, 7, 9), 27.VIII.a : golfe de Gascogne - nord (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10), 27.VIII.b : golfe de Gascogne - central (1,2,3,5,8, 9,10), 27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud (2, 3), 27.VIII.d : golfe de Gascogne - large (2, 7, 9), 37.1.2 : golfe du Lion (2, 3, 5, 8, 10, 17)

Figure 65 : Distribution des espèces appartenant au genre *Pseudoterranova* dans seize espèces de poisson provenant des zones de pêche FAO 27 Atlantique Nord-Est et 37 mer méditerranée – mer noire.

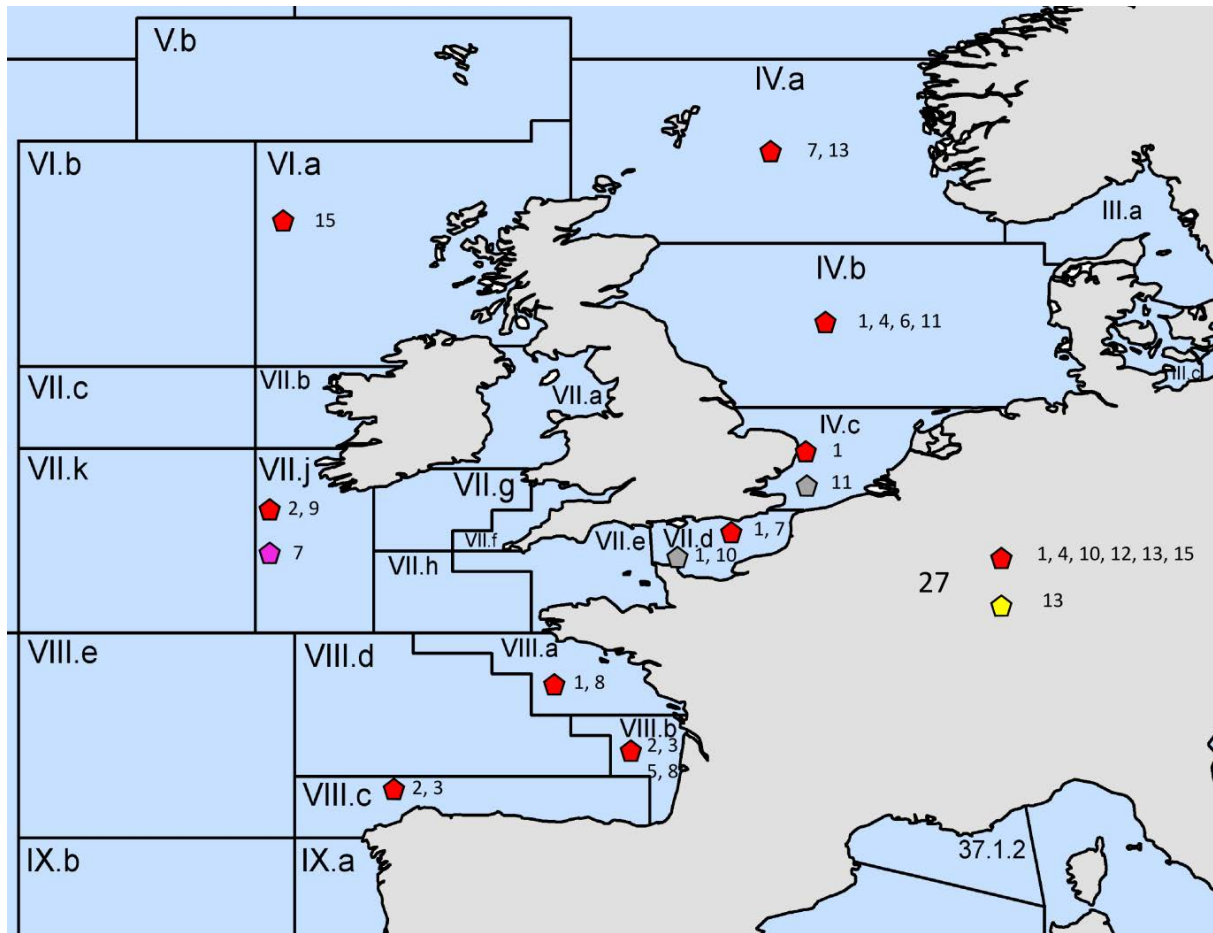
Trois espèces appartenant au genre *Pseudoterranova* ont été identifiées (*P. decipiens*, *P. krabbei*, *P. ceticola*) (Figure 65). Pour certains individus, seul le genre a pu être défini : *Pseudoterranova* ND.

Dans notre étude, l'espèce *Pseudoterranova decipiens* a été observée chez le cabillaud en mer Celtique-sud, chez la baudroie dans le golfe de Gascogne nord et chez le merlu dans le golfe de Gascogne central. Cette espèce a été précédemment observée dans l'océan Atlantique Nord-Est mais chez le maquereau commun (Huang, 1988) et le lieu noir (Piccolo *et al.*, 1999). Elle a été identifiée également chez le cabillaud (*Gadus morhua*) provenant de la mer Baltique (Lunneryd *et al.*, 2015). L'infection chez le cabillaud en mer Celtique dans notre étude et en mer Baltique dans la littérature montre que le facteur favorisant l'infection par *P. decipiens* est probablement lié à l'espèce de poisson car les deux localisations géographiques sont assez éloignées.

L'espèce *Pseudoterranova krabbei* a été retrouvée dans la plupart des sous-zones géographiques explorées dans cette étude. Dans notre étude, elle infectait jusqu'à six espèces de poisson dans la mer Celtique-sud (merlan, merlu, cabillaud, églefin, baudroie et lieu noir). Les cabillauds étaient infectés par *P. krabbei* dans la mer du Nord-centrale et sud, la Manche-Est, la mer Celtique-Nord et sud, le Sud-ouest d'Irlande-est. Selon Mattiucci et Nascetti, cette espèce infecte les cabillauds localisés autour du plateau des îles Féroé (Mattiucci et Nascetti, 2008). Mais ces séquences de *P. krabbei* issues du HTS doivent être revérifiées puisque la base de données dans notre pipeline d'analyse Nonnoy ne contenait pas de séquences de *P. decipiens*.

L'espèce *Pseudoterranova ceticola* a été identifiée dans un lot de linges bleues provenant de la zone majeure océan Atlantique Nord-Est. Mais la séquence COX2 de référence correspondant à *P. ceticola* et permettant d'identifier nos séquences inconnues montre une position proche d'*Anisakis* (même clade) lorsqu'elle est alignée avec d'autres séquences extraites des banques de données publiques. Cette séquence annotée comme provenant de l'espèce *P. ceticola* a peut-être été identifiée de façon erronée par l'auteur lors du dépôt de la séquence dans la banque puisque *P. ceticola* n'a pas été décrit chez le poisson. Il n'existe donc pas de données quant à sa répartition géographique.

III.3.4. *Distribution géographique des espèces du genre Hysterothylacium*



H. aduncum



H. deardorffoverstreetorum



H. reliquens



Hysterothylacium ND

Un numéro correspond à une espèce de poisson 1 : merlan (*Merlangius merlangus*), 2 : merlu (*Merluccius merluccius*), 3 : anchois (*Engraulis encrasicolus*), 4 : cabillaud (*Gadus morhua*), 5 : sardine (*Sardina pilchardus*), 6 : hareng (*Clupea harengus*), 7 : églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), 8 : maquereau commun (*Scomber scombrus*), 9 : baudroie (*Lophius piscatorius*), 10 : bar (*Dicentrarchus labrax*), 11 : sole (*Sole solea*), 12 : langue bleue (*Molva dypterygia*), 13 : lieu noir (*Pollachius virens*), 14 : saumon atlantique (*Salmo salar*), 15 : langue franche (*Molva molva*), 16 : cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), 17 : maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) et 18 plie (*Pleuronectes platessa*).

Les espèces de poisson prélevées dans différentes zones, 27 : Atlantique Nord-Est (1, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15), 27.II.b : Spitzberg et île aux Ours (14), 27.IV.a : mer du Nord-nord (7, 13), 27.IV.b : mer du Nord centrale (1, 4, 6, 11), 27.IV.c : mer du Nord-sud (1, 2, 4, 6, 8), 27.V.b : eaux Féringiennes (12), 27.VI : Rockall, côte nord-ouest de l'Écosse et nord de l'Irlande; la côte nord-ouest de l'Écosse et le nord de l'Irlande sont aussi appelés Ouest Écosse (9), 27.VI.a : côte nord-ouest de l'Écosse et Irlande du Nord ou Ouest Écosse (15), 27.VII.d : Manche Est (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 18), 27.VII.f : Canal de Bristol (7, 9), 27.VII.g : mer Celtique-nord (2, 4, 7, 9, 15), 27.VII.h : mer Celtique-sud (1, 2, 4, 7, 9, 13, 16), 27.VII.j : Sud-ouest de l'Irlande - est (2, 4, 7, 9), 27.VIII.a : golfe de Gascogne - nord (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10), 27.VIII.b : golfe de Gascogne - central (1, 2, 3, 5, 8, 9, 10), 27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud (2, 3), 27.VIII.d : golfe de Gascogne - large (2, 7, 9), 37.1.2 : golfe du Lion (2, 3, 5, 8, 10, 17)

Figure 66 : Distribution des espèces appartenant au genre *Hysterothylacium* dans seize espèces de poisson

Trois espèces appartenant au genre *Hysterothylacium* ont été identifiées : *H. aduncum*, *H. deardorffoverstreetorum* et *H. reliquens* (Figure 66). L'espèce *Hysterothylacium aduncum* était présente dans plusieurs sous-zones de pêche. Elle a été observée chez la langue franche dans la sous-

zone 27.VI.a côte nord-ouest de l'Écosse et Irlande du Nord ou Ouest Ecosse, chez l'églefin, le lieu noir, le merlan, le cabillaud, le hareng et la sole en mer du Nord, chez le merlan et l'églefin en Manche Est, chez le merlu et la baudroie au Sud-ouest de l'Irlande - Est, chez le merlan dans le golfe de Gascogne-nord et chez le merlu dans le golfe de Gascogne central. Cette espèce a été décrite principalement chez des espèces commerciales, et surtout celles appartenant à l'ordre des gadiformes (Klimpel et Rückert, 2005). Dans notre étude, c'est le cas pour le merlu, le merlan, l'églefin, le cabillaud, le lieu noir et la lingue franche. Mais, notre résultat montre que cette espèce infecte également les clupéiformes (hareng, sardine, anchois), les lophiiformes (baudroie) et les perciformes (maquereau commun). Une étude ancienne l'avait identifiée également en mer du Nord dans les eaux Norvégiennes chez le lieu noir (Berland, 1961).

Hysterothylacium reliquens a été retrouvé chez l'églefin dans le Sud-ouest d'Irlande - Est. Cette espèce a été identifiée chez le rondeau mouton (*Archosargus probatocephalus*, famille des *Sparidae*) à l'embouchure du Mississippi, dans le golfe du Mexique (Norris et Overstreet, 1975). C'est la première description chez les égles dans cette zone Sud-ouest d'Irlande-est.

L'espèce *Hysterothylacium deardorffoverstreetorum* a été identifiée chez le lieu noir dont la sous-zone n'a pu être précisée. D'après la littérature, elle infecte le poisson plat (*Paralichthys isosceles*) au large de d'Angra dos Reis sur les côtes du sud du Brésil (Gopar-Merino *et al.*, 2005). C'est la première description chez le lieu noir dans l'océan Atlantique Nord-Est.

III.3.5. Synthèse des différentes répartitions des Anisakidae

Finalement, si on superpose les quatre cartes, la zone V.b des eaux Féringiennes présentait la diversité en Anisakidae la plus importante mais une seule espèce de poisson y a été échantillonnée : la lingue bleue. Cette diversité peut être finalement due à l'espèce de poisson. Il y avait au total sept espèces d'*Anisakis*, *C. osculatum*, *Phocascaris cystophorae* et *P. krabbei* provenant de la lingue bleue (*Molva dypterygia*). Dans le golfe du Lion (37.1.2), une seule espèce a été détectée *A. pegreffii* mais il y a également des individus appartenant au genre *Anisakis* mais dont l'espèce n'a pu être déterminée.

La Manche Est (VII.d), la mer Celtique centrale (VII.h), le golfe de Gascogne-Nord (VIII.a) étaient les sous-zones où il y a eu le plus de prélèvements. Presque toutes les espèces de poisson de tous les lots étaient infectées par *Anisakis* et *P. krabbei* en mer Celtique centrale. Dans les sous-zones proches comme le sud-ouest de l'Irlande-est (VII.j), la mer Celtique sud (VII.h), le golfe de Gascogne nord (VIII.a), central (VIII.b), sud (VIII.c) et au large (VIII.d), circulent des poissons parasités par *A. simplex*, *A. pegreffii* et *Anisakis* ND. Le profil d'infestation des poissons similaire entre les différentes zones de capture voisines laisse supposer qu'il y a une migration des poissons par exemple chez le

merlu, la baudroie et l'églefin, qui ont été infectés par *A. pegreffi* et *A. simplex*. Cette observation a été déjà faite chez le merlu dans la littérature (Mattiucci *et al.*, 2004)

III.3.6. Quelques observations sur la distribution des Anisakidae dans certaines espèces de poisson

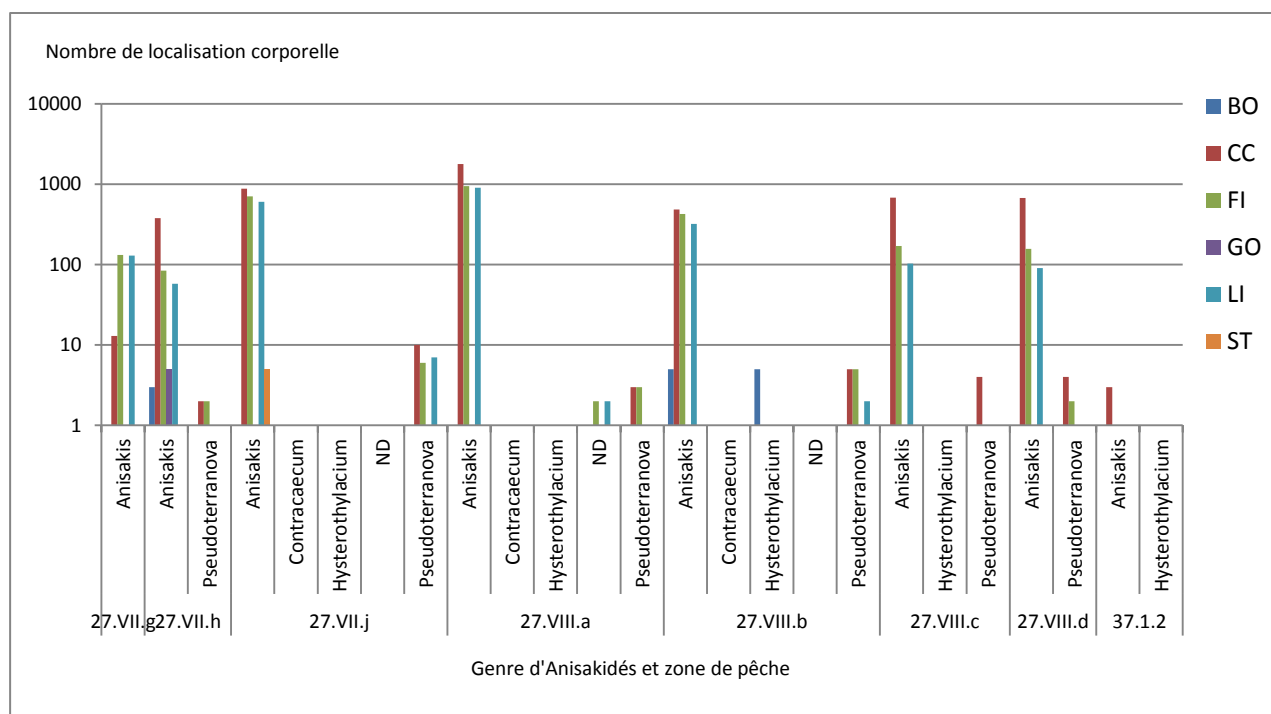


Figure 67 : Nombres d'Anisakidae identifiés dans le merlu (*Merluccius merluccius*) dans différentes localisations corporelles en fonction de la zone de pêche (échelle logarithmique)
BO : intestin, CC : cavité corporelle, FI : filet, GO : gonades, LI : foie et ST : estomac.

La Figure 67 montre l'infestation par les Anisakidae chez le merlu (*Merluccius merluccius*) selon les zones de pêche et les localisations corporelles. Ainsi, les *Anisakis* spp. infestaient toujours au moins les filets, le foie et la cavité corporelle de la mer Celtique nord jusqu'au sud-ouest d'Irlande-est vers les 3 zones du golfe de Gascogne avec une observation semblable. Les espèces présentes dans ces zones étaient *A. pegreffi* et *A. simplex*. Selon la littérature, une sympatrie existe entre ces deux espèces dans les eaux de l'océan Atlantique (Mattiucci *et al.*, 2004 ; Mattiucci et Nascetti, 2007 ; Pontes *et al.*, 2005). Cette observation renforce les résultats existant dans la littérature en montrant le même phénomène chez le merlu avec une zone géographique plus précise. De plus, le fait d'identifier *A. pegreffi* chez le merlu en mer Méditerranée (37.1.2, golfe du Lion), laisse supposer qu'il y a une migration du merlu vers la mer d'Alboran ou vice versa comme le montrent Mattiucci *et al.*, 2004. Effectivement, selon Mattiucci *et al.* (2004), la migration du merlu vers la mer d'Alboran est justifiée par les observations d'*A. pegreffi* dans le merlu.

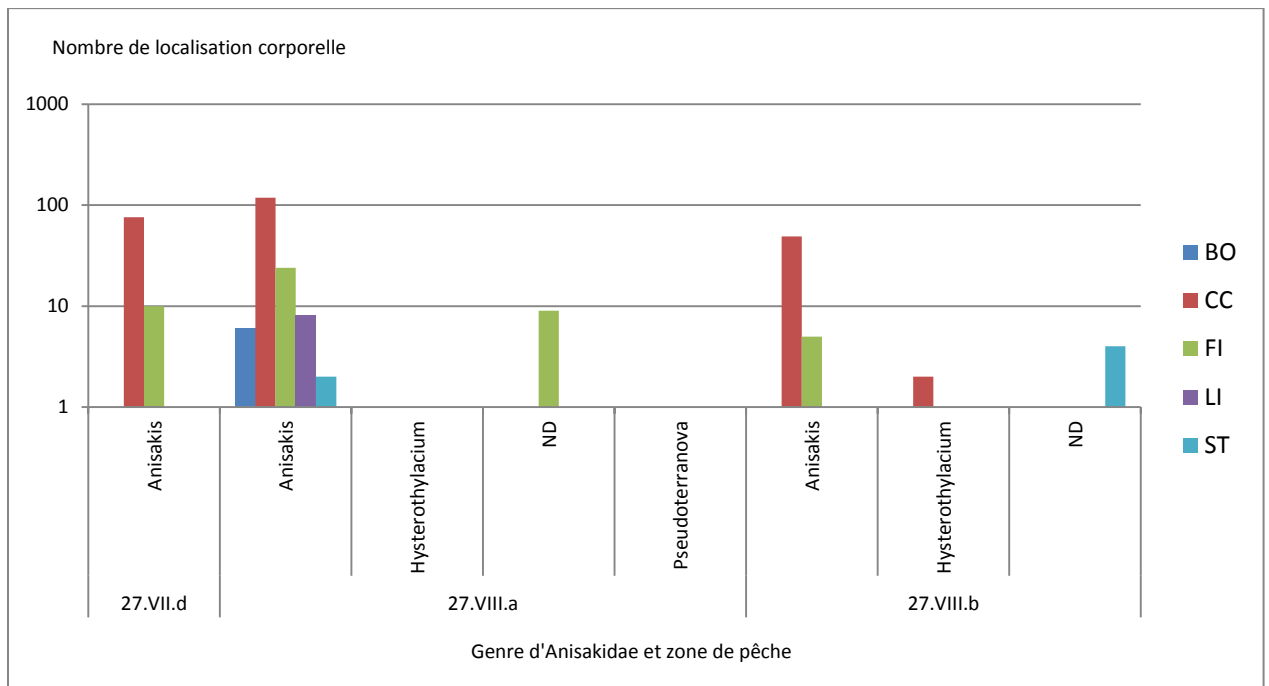


Figure 68 : Nombres d'Anisakidae identifiés dans le maquereau commun (*Scomber scombrus*) dans différentes localisations corporelles en fonction de la zone de pêche (échelle logarithmique)
BO : intestin, CC : cavité corporelle, FI : filet, GO : gonades, LI : foie et ST : estomac.

De la même façon que pour le merlu, la Figure 68 montre que les *Anisakis* spp. infectaient les maquereaux communs (*Scomber scombrus*) de la même façon dans deux sous-zones. En effet, les parasites étaient présents dans la cavité corporelle et dans les filets en Manche Est (VII.d) et dans le golfe de Gascogne nord (VIII.a) et central (VIII.b). L'espèce *Anisakis simplex* était présente dans ces 3 zones de pêche. *A. simplex* s.s a été décrite chez le maquereau commun dans l'océan Atlantique Nord-Est (côte Espagne) (Abollo *et al.*, 2001).

III.4. Prévalence et proportion de la contamination par les Anisakidae

III.4.1. Proportion dans les différentes localisations corporelles du poisson

Au total, la présence de nématodes a été recherchée dans neuf localisations (BO, BS, CC, FI, GI, GO, LI, OC et ST) comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes (1.2 protocole de dissection des poissons). Ainsi, 17 680 localisations corporelles des 18 espèces de poisson ont donc été disséquées et minutieusement observées pour la recherche de parasites.

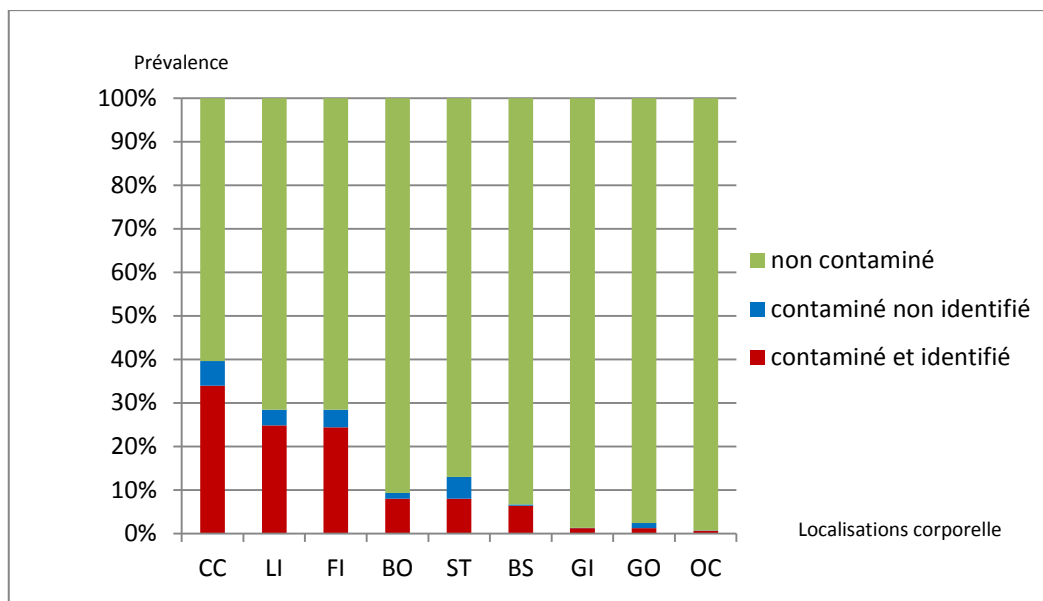


Figure 69 : Proportion des Anisakidae dans les différentes localisations corporelles des 1 768 poissons analysés. BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac.

Parmi les neuf localisations corporelles de poissons observées, tous les poissons n'étaient pas infectés dans toutes les localisations corporelles. Pour une localisation corporelle donnée, la plupart des poissons n'étaient pas parasités par les Anisakidae (Figure 69, couleur verte). Sièze espèces de poisson étaient contaminées.

Il y a 33,94 % des poissons dont la cavité corporelle était contaminée par des Anisakidae ; 24,83 % chez qui les parasites étaient présents dans le foie et 24,38 % dans les filets (Figure 69). Ces trois localisations corporelles étaient les plus infestées. Il existe également un pourcentage de poissons contaminés par des nématodes qui n'ont pas été identifiés (couleur bleue). Ceci est dû soit à un problème technique lors de l'identification (dysfonctionnement de la PCR) soit l'échantillon a été perdu après consignation du nombre de parasites, soit l'échantillon n'a pas été sélectionné pour l'analyse pour des raisons de temps et de budget.

III.4.2. Prévalence des différents genres d'Anisakidae dans les différentes localisations corporelles pour l'ensemble des poissons

La Figure 70 représente la prévalence des Anisakidae dans les différentes localisations corporelles pour l'ensemble des poissons avec un intervalle de confiance de 95 %. Ce graphique donne une vue globale de l'infestation par les 5 genres d'Anisakidae et les nématodes non déterminés dans 1 696 poissons appartenant à 16 espèces contaminées. Les 4 genres les plus retrouvés étaient *Anisakis*, *Hysterothylacium*, *Contracaecum* et *Pseudoterranova*. *Anisakis* était présent avec la prévalence la plus élevée. La Figure 70 détaille plus finement la prévalence de chaque genre de parasite dans chaque localisation corporelle analysée dans les poissons sur l'ensemble des échantillons analysés.

Anisakis spp. (en bleu) infestait 8 localisations corporelles des poissons. C'était le genre dominant dans la cavité corporelle ($31,4 \pm 2,2$ %) le foie ($23,4 \pm 2$ %), les filets ($23,2 \pm 2$ %). Les autres localisations corporelles contaminées par ce genre, le sont à hauteur de $0,1 \pm 0,2$ % dans les branchies à $2,7 \pm 0,8$ % dans l'intestin. Il a déjà été décrit dans plusieurs localisations corporelles telles que la cavité corporelle, les viscères et dans la chair en faible pourcentage (Abollo *et al.*, 2001 ; Smith et Wootten, 1984a).

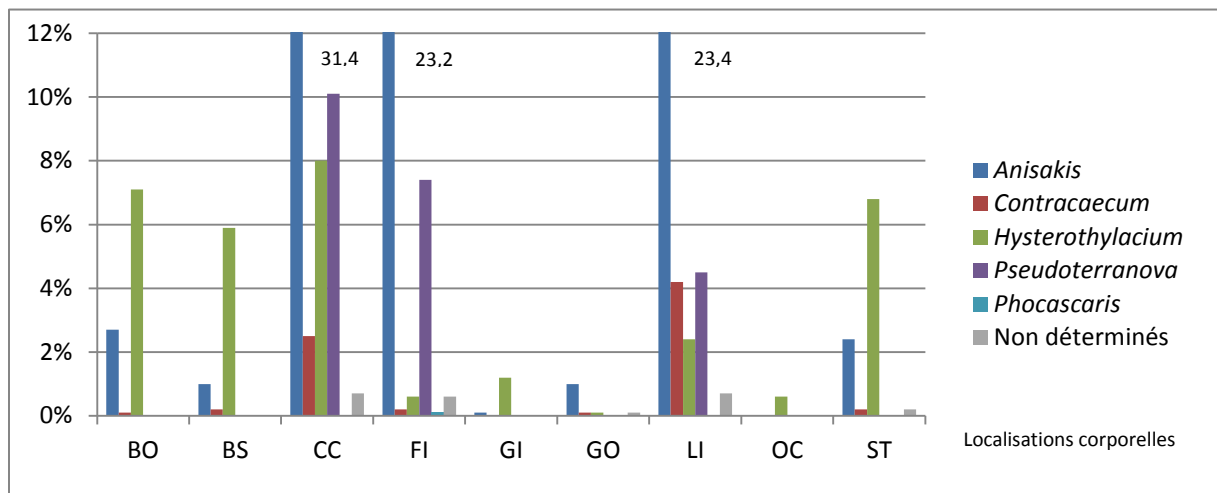


Figure 70 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae dans les différentes localisations corporelles de l'ensemble des poissons.

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Contracaecum spp. (en rouge) était présent dans sept localisations corporelles. Il était présent à $4,2 \pm 1$ % dans le foie après *Anisakis* et *Pseudoterranova*, $2,5 \pm 0,8$ % dans la cavité corporelle et seulement $0,2 \pm 0,2$ % dans les filets. Il infeste seulement de $0,1$ à $0,2$ % de prévalence dans les autres localisations corporelles. La localisation corporelle préférentielle chez les poissons semble être le foie pour ce genre d'Anisakidae. Une autre étude a indiqué que les *Contracaecum* utilisés lors d'expériences *in vitro*, avaient été isolés du foie et du rein de mullet (*Mugil cephalus*) et des mésentères du tambour rouge (*Sciaenops ocellata*) (Deardorff et Overstreet, 1980).

Hysterothylacium spp. (en vert) était présent dans les 9 localisations corporelles des poissons. C'était le seul genre présent dans la bouche des poissons ($0,6 \pm 0,4$), à $8,0 \pm 1,3$ % dans la cavité corporelle, $7,1 \pm 1,2$ % dans l'intestin, $6,8 \pm 1,2$ % dans l'estomac et $5,9 \pm 1,1$ % à la surface corporelle. Ce genre était majoritaire dans ces 4 parties. Les autres localisations corporelles qu'il infestait ne l'étaient qu'à hauteur de $0,6$ % à $2,4$ %.

Pseudoterranova spp. (en mauve) n'était présent que dans 3 localisations corporelles : cavité corporelle ($10,10 \pm 1,5$ %), filets ($7,4 \pm 1,3$ %) et foie ($4,5 \pm 1$ %). Ce genre était en deuxième position après *Anisakis* pour ces localisations corporelles. Ce résultat est concordant avec ce qui a été

présenté par Smith et Wootten : *Pseudoterranova* reste plutôt dans les flancs et une partie des filets (Smith et Wootten, 1984b).

Phocascaris spp. (en bleu clair) était présent dans les filets à $0,1 \pm 0,1$ %. Il a été rapporté il y a trente ans que ce genre présentait moins de risque par rapport à *Anisakis* ou *Pseudoterranova* car il est rarement trouvé dans les filets de poisson (Smith, 1984).

Les nématodes dont le genre n'a pas été déterminé (en gris) étaient présents dans cinq localisations corporelles dont une majorité dans la cavité corporelle et dans le foie au même pourcentage ($0,7 \pm 0,4$ %), dans les filets ($0,6 \pm 0,4$ %) et d'autres localisations corporelles entre 0,1 % à 0,2 %.

La présence d'*Hysterothylacium* spp. sur la surface corporelle et la bouche puis *Contraecaecum* spp. et *Anisakis* spp. à la surface corporelle, était probablement un artefact puisque ces parasites se déplacent à partir du tube digestif ou de la cavité corporelle lors de l'altération du poisson (Lena N. Measures, 2014), une mobilité des parasites d'une localisation corporelle vers une autre ayant été observée. Tous les genres sauf *Pseudoterranova*, ont été observés à la surface corporelle du poisson. Berland (1980) estimait que les vers du genre *Hysterothylacium* ne sont pas de vrais parasites ; ils entretiennent plutôt des relations de mutualisme avec leur hôte puisqu'ils sont capables de décomposer les aliments ingérés par leurs hôtes ce qui permet l'accélération de la digestion (Berland, 1991 ; Berland, 1980). D'autres auteurs ont également expliqué que ce genre n'était pas pathogène pour l'Homme et que leur organe cible étaient le tube digestif. De plus, ils ne pourraient pas survivre à une température de 37 °C (Huang, 1988 ; Miliotis et Bier, 2003). En revanche, certaines études ont montré la présence d'*H. aduncum* dans la chair d'anchois (*Engraulis encrasicolus*) de la mer Tyrrhénienne au large de l'Italie, ainsi que dans les viscères et les muscles de sardines : *Sardina pilchardus* (Liberato *et al.*, 2013). Dans notre étude, il était présent dans les filets à 0,6 % de prévalence (dans le merlan, le merlu, le cabillaud, l'églefin, le maquereau commun et le lieu noir). Mais ceci est vraisemblablement dû à sa mobilité à partir des localisations corporelles d'origine (estomac et intestin) quand les poissons étaient en mauvais états comme le cas d'*Anisakis*, *Contraecaecum* sur la surface corporelle et *Anisakis* dans les branchies.

La comparaison des résultats sur la localisation des parasites entre différentes études est parfois difficile voire impossible. En effet, chaque auteur définit les localisations différemment. Par exemple, certains auteurs considèrent les mésentères comme une localisation alors que d'autres ne considèrent que la cavité corporelle (Abollo *et al.*, 2001).

III.4.3. Prévalence globale des Anisakidae dans les localisations corporelles les plus consommées

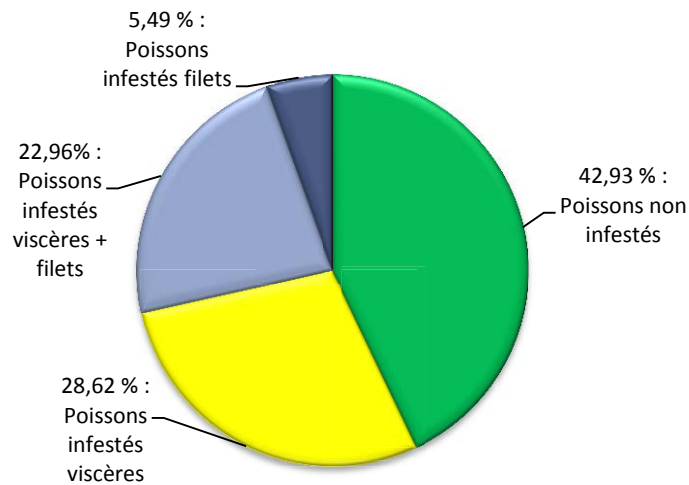


Figure 71 : Prévalence globale des Anisakidae dans les viscères, les viscères et filets et les filets des 1 768 poissons analysés appartenant à 18 espèces.

La Figure 71 représente la prévalence des Anisakidae dans les localisations corporelles des poissons. Ce résultat ne tient pas compte des nématodes isolés mais non identifiés. Les filets sont de fait une partie consommée mais les viscères peuvent l'être également, par exemple, le foie et les gonades. Il est donc important de distinguer la prévalence des Anisakidae dans ces localisations corporelles. Sur 1 768 poissons appartenant à 18 espèces, 42,93 % des poissons n'étaient pas infectés par les Anisakidae ; 28,62 % des poissons étaient infectés par des Anisakidae dans les viscères ; 22,96 % des poissons étaient infectés à la fois dans les viscères et les filets. Enfin, 5,49 % des poissons n'étaient infectés par des Anisakidae que dans les filets (Figure 71). Plusieurs études montrent la prévalence plus élevée dans les viscères que dans les autres localisations corporelles (Bernardi *et al.*, 2011 ; Levsen *et al.*, 2005).

Parmi les espèces infectées, toutes étaient infestées par des Anisakidae dans leurs viscères. Les cinq espèces les plus infectées, par ordre décroissant étaient : le lieu noir (100 %), la cardine franche (95 %), le cabillaud (86,23 %), la lingue franche (76,19 %) et le hareng (69,30 %) (Figure 72).

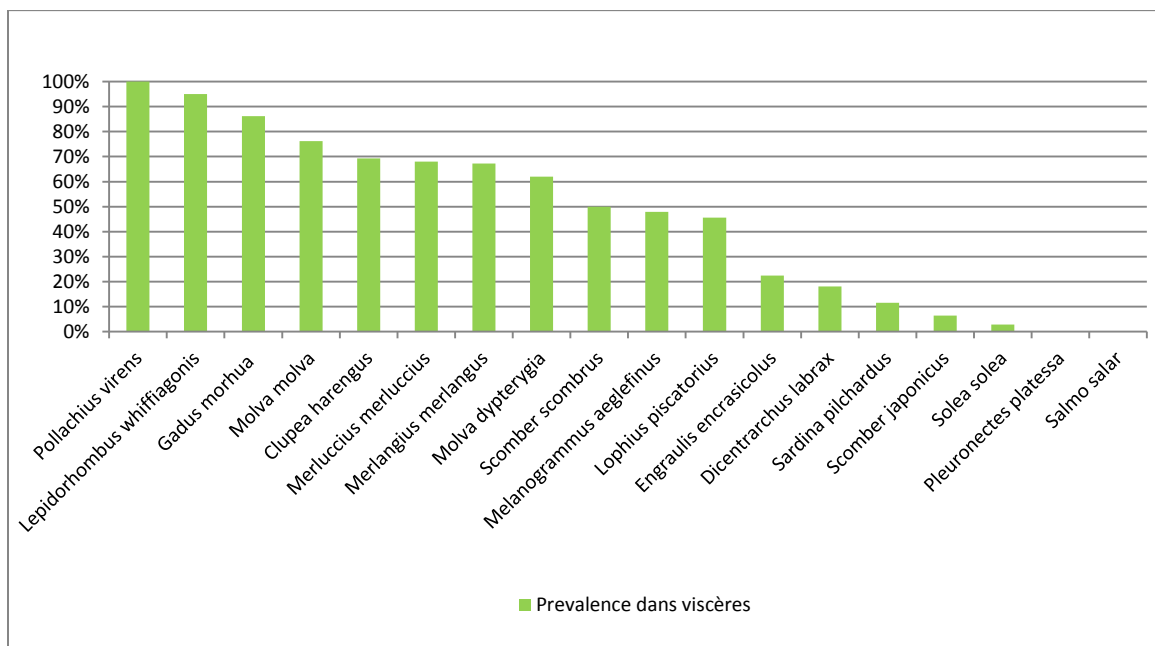


Figure 72 : Prévalence des Anisakidae dans les viscères de 1 768 poissons classés par espèce de poisson et par prévalence décroissante.

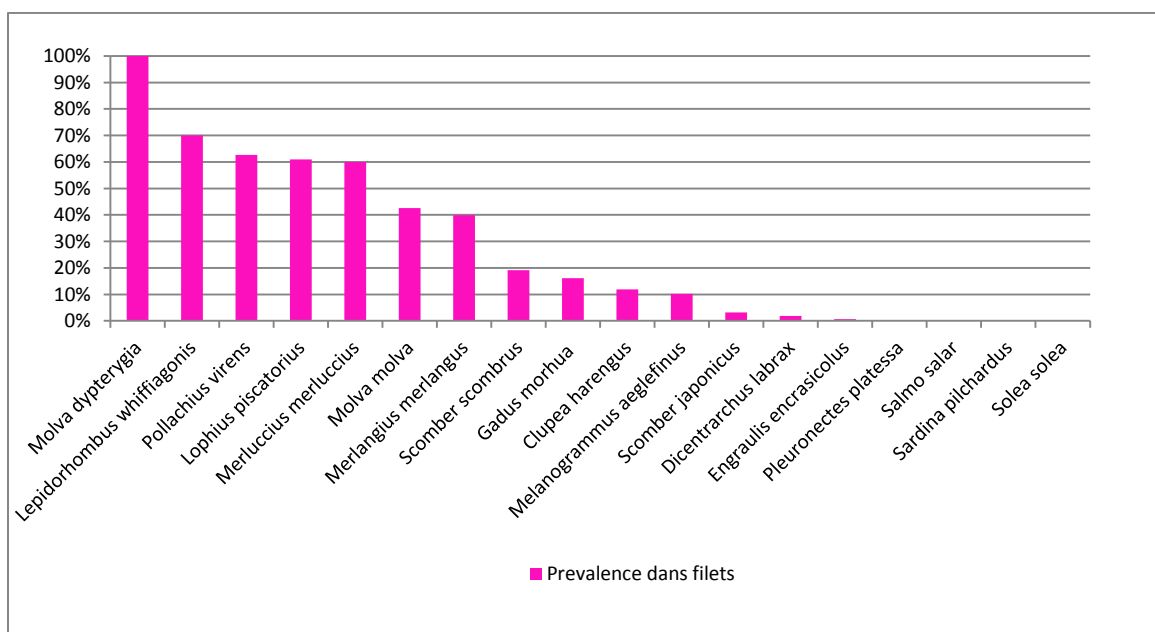


Figure 73 : Prévalence des Anisakidae dans les filets de 1 768 poissons classés par espèce de poisson et par prévalence décroissante.

En tenant compte uniquement des Anisakidae identifiés dans les filets, partie la plus consommée chez les poissons, les cinq espèces les plus infectées, par ordre décroissant étaient : la lingue bleue (*Molva dypterygia*) à 100 %, la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*, espèce non prévue dans le plan d'échantillonnage) à 70 %, le lieu noir (*Pollachius virens*) à 62,67 %, la baudroie (*Lophius piscatorius*) à 60,95 % et le merlu (*Merluccius merluccius*) à 60 %. Les autres espèces étaient infectées dans les filets entre 0,68 et 42,55 %.

Chez la lingue bleue et la baudroie, les filets (70 et 61 % respectivement) étaient plus parasités que les viscères (62 et 46 % respectivement). Ceci est dû au manque d'information sur les viscères d'un lot de baudroie et de deux lots de lingue bleue. En effet, ces deux poissons sont en général vendus éviscérés et il n'a pas été possible d'obtenir des lots de poissons non éviscérés dans certains cas. Ainsi, la prévalence et l'intensité des Anisakidae pour les viscères dans ces espèces ont été minimisées au cours de notre étude

III.4.4. Proportion dans les différentes espèces de poisson

Cette partie décrit la prévalence des Anisakidae en fonction des espèces de poisson (Figure 74). Un poisson a été considéré comme contaminé dès qu'un des parasites qu'il contenait a été clairement identifié comme faisant partie de la famille des Anisakidae. Certains poissons étaient contaminés sans que l'appartenance du ou des parasites à la famille des Anisakidae n'ait été clairement établie.

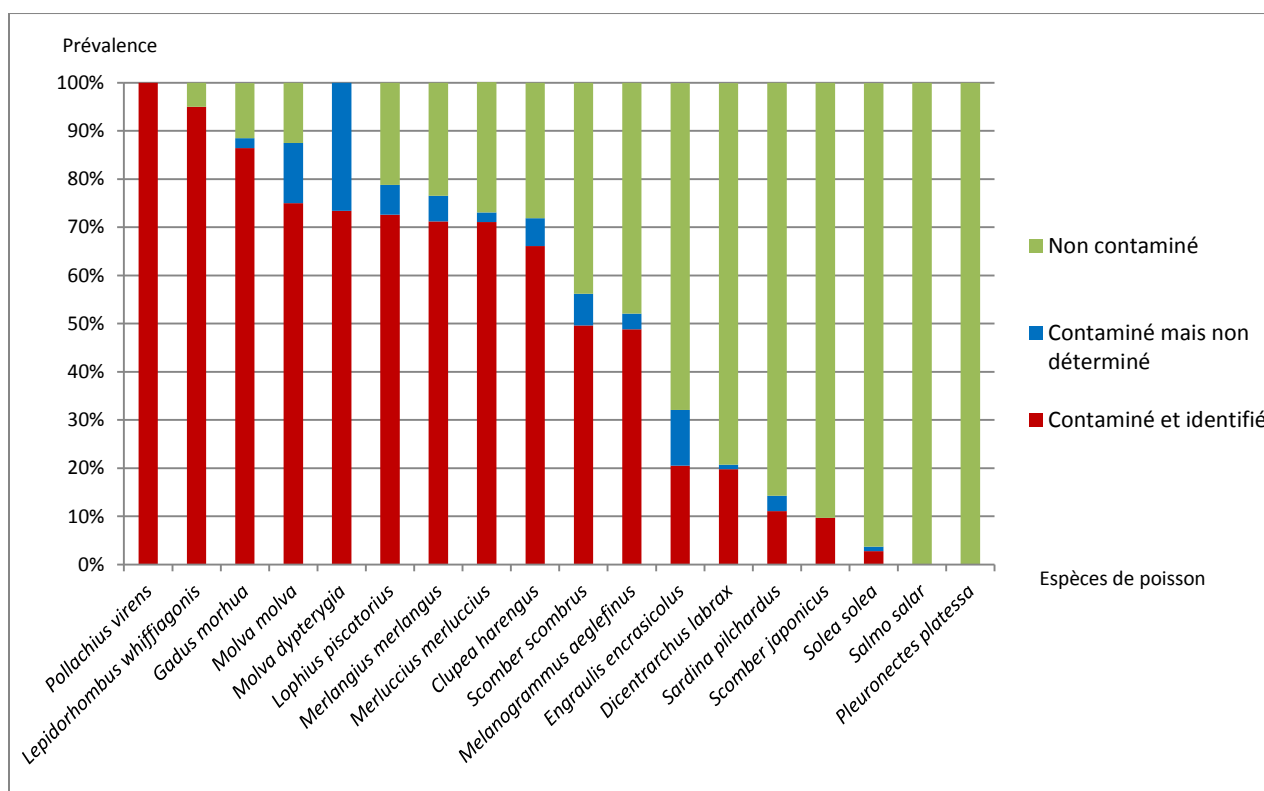


Figure 74 : Prévalence des Anisakidae et des nématodes non identifiés dans les 18 espèces de poisson classées par prévalence décroissante.

Deux espèces de poisson n'étaient pas du tout parasitées par cette famille de parasites : le saumon Atlantique (*Salmo salar*, lot issu de l'aquaculture) et la plie (*Pleuronectes platessa*). Les espèces de poisson les plus parasitées par des individus de la famille des Anisakidae étaient le lieu noir (*Pollachius virens*) pour lequel 100 % des individus analysés étaient parasités, la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) avec 95 % d'individus parasités, le cabillaud (*Gadus morhua*) avec 86,4 %, la lingue franche (*Molva molva*) avec 75 % et la lingue bleue (*Molva dypterygia*) avec 73,4 %. La

baudroie (*Lophius piscatorius*), le merlan (*Merlangius merlangus*) et le merlu (*Merluccius merluccius*) étaient parasités pour 71 à 72 % des individus. Les espèces moyennement parasitées étaient le hareng (*Clupea harengus*) avec 66 % des individus parasités, l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*) avec 49 % et le maquereau commun (*Scomber scombrus*) avec 48 %. Enfin, les cinq espèces les moins parasitées l'étaient de 2,8 à 20 %. Pour certaines espèces, une partie des nématodes n'ont pas encore été identifiés par manque de temps et de budget (lingue bleue, langue franche, merlu, etc...). Ainsi, si les échantillons contenant des nématodes non identifiés sont écartés de l'analyse, les cinq premières espèces de poissons dont le pourcentage en Anisakidae était le plus élevée sont la langue bleue (100 %), le lieu noir (100 %), la cardine franche (95 %), le cabillaud (89,13 %) et la langue franche (88,10 %) (Figure 75).

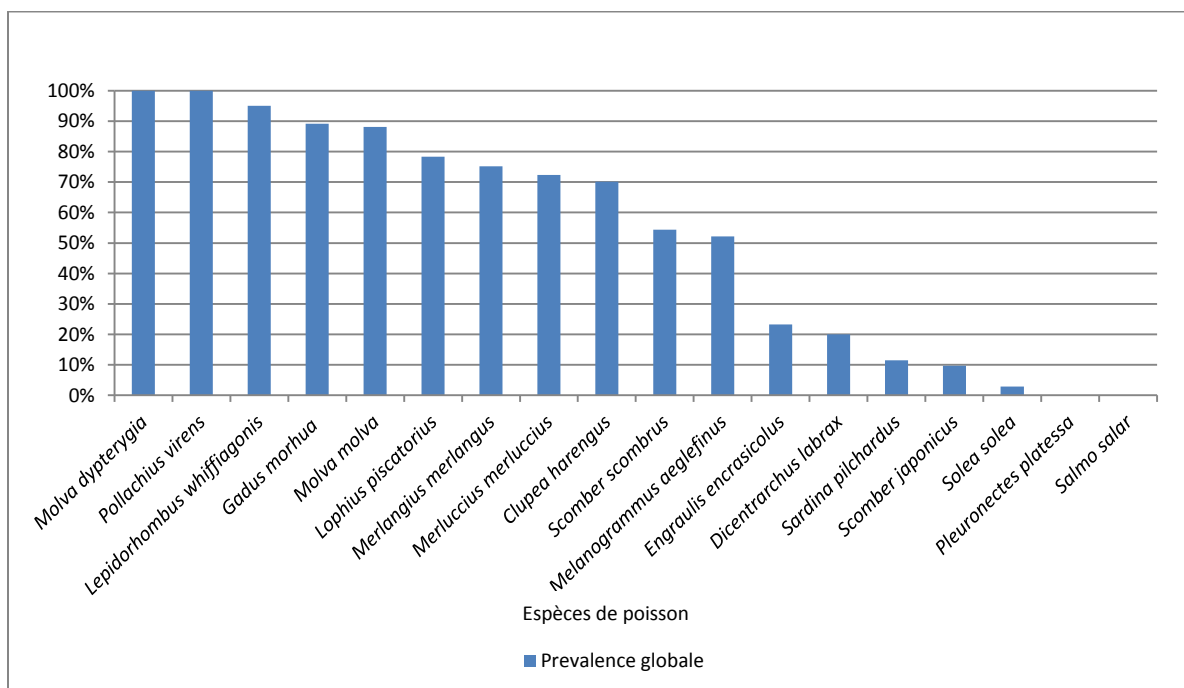


Figure 75 : Prévalence totale des Anisakidae dans les 1 768 poissons classés par prévalence décroissante.

III.4.5. Prévalence des différents genres d'Anisakidae dans différentes localisations corporelles par espèce de poisson

Les 16 figures suivantes sont classées par ordre alphabétique des noms latins des espèces de poisson (intervalle de confiance calculé à 95 %). Il manque également les données dans les viscères pour un lot de baudroie et deux lots de langue bleue qui ont été éviscérés à bord. Globalement, parmi les cinq genres identifiés et les nématodes non déterminés, seule la langue bleue (*Molva dypterygia*) était infectée par l'ensemble des genres identifiés. Huit espèces de poissons étaient infestées par quatre genres d'Anisakidae : le merlan (*Merlangius merlangus*), le merlu (*Merluccius merluccius*), le cabillaud (*Gadus morhua*), le hareng (*Clupea harengus*), l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), la

baudroie (*Lophius piscatorius*), le lieu noir (*Pollachius virens*) et la lingue franche (*Molva molva*). Le maquereau commun (*Scomber scombrus*) et le bar (*Dicentrarchus labrax*) étaient infectés par trois genres d'Anisakidae. L'anchois (*Engraulis encrasicolus*), la sardine commune (*Sardina pilchardus*) et la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) étaient infectés par deux genres d'Anisakidae. La sole (*Solea solea*) et le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*) étaient infectés par un seul genre d'Anisakidae. Le merlan était le poisson dont les neuf localisations corporelles étaient infectées par des Anisakidae ; chez le lieu noir, huit localisations corporelles étaient infectées ; chez le cabillaud et la lingue bleue, sept localisations corporelles ; chez le merlu, six localisations corporelles ; chez l'églefin et la lingue franche, cinq localisations corporelles. Pour les autres espèces, elles étaient infectées dans deux à cinq localisations corporelles. Les résultats pour chaque espèce de poisson sont détaillés ci-après.

- ***Clupea harengus***

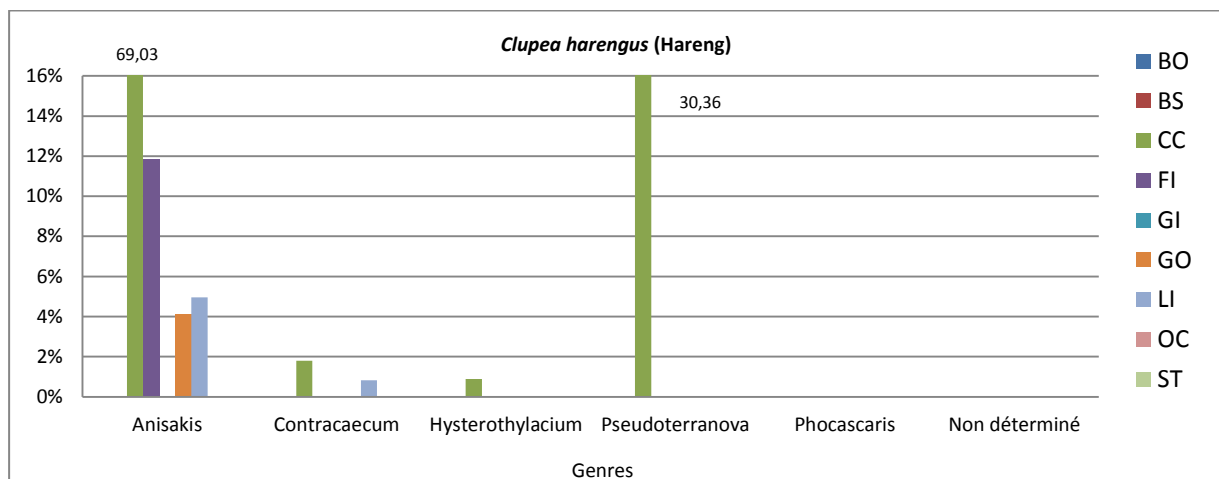


Figure 76 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du hareng (*Clupea harengus*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Les quatre genres étaient présents dans le hareng (*Clupea harengus*). *Anisakis* présentait une prévalence de $69,03 \pm 8,5$ % dans la cavité corporelle, *Pseudoterranova* de $30,36 \pm 8,5$ % et *Contracaecum* et *Hysterothylacium* étaient également présents dans la cavité corporelle mais avec une faible prévalence (1,79 % et 0,89 % respectivement au maximum). Les filets étaient contaminés uniquement par *Anisakis* à $11,86 \pm 5,8$ % de prévalence.

Pour les harengs provenant de la mer du Nord, de la Manche Est et de la zone majeure océan Atlantique Nord-Est, la prévalence globale était de 70,18 %, 69,30 % pour les viscères et 11,86 % dans les filets pour un total de 121 poissons. La prévalence d'*Anisakis* spp. déterminée par Huang était de 82,55 % sur 682 poissons provenant du marché parisien (Huang, 1988). Selon l'étude de Levsen *et al.*

en 2005, la prévalence était de 0,74 % dans les filets mais de 94,9 % dans les viscères de hareng provenant des eaux norvégiennes (Levsen *et al.*, 2005). Ces données de prévalence confirment que la prévalence des Anisakidae dans les harengs reste basse dans les filets par rapport aux viscères.

- ***Dicentrarchus labrax***

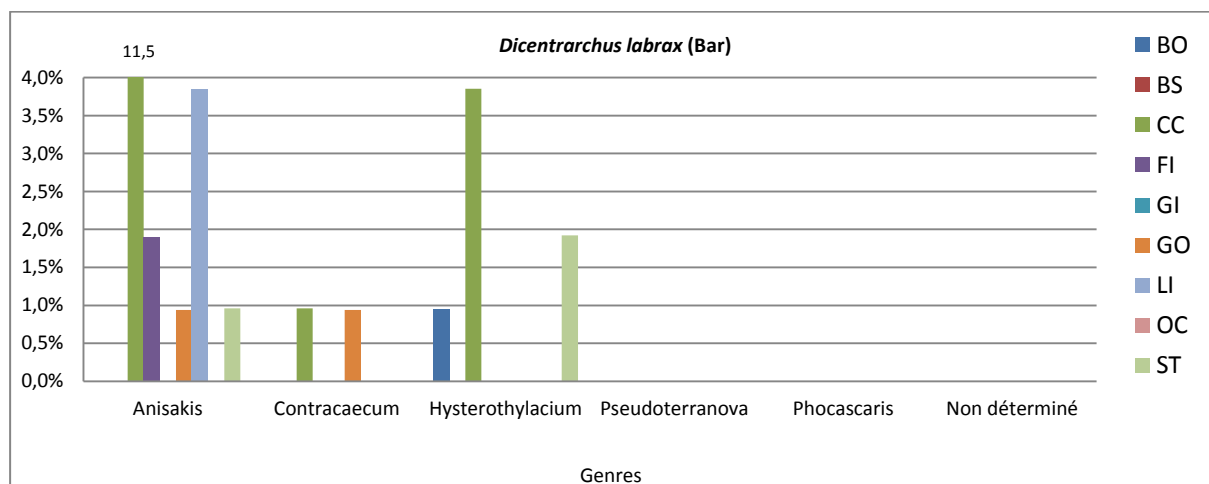


Figure 77 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du bar (*Dicentrarchus labrax*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Six localisations corporelles du bar (*Dicentrarchus labrax*) étaient contaminées par trois genres d'Anisakidae. *Anisakis* a été identifié dans cinq localisations corporelles et en majorité dans la cavité corporelle à $11,54 \pm 6,1$ %. La prévalence d'*Anisakis* dans le foie était de $3,85 \pm 3,7$ %. *Hysterothylacium* parasitait trois localisations corporelles et il était présent avec une prévalence élevée par rapport aux autres genres dans la cavité corporelle (3,85 %). *Contracecum* présentait une faible prévalence de moins de 1 % dans la cavité corporelle et dans les gonades.

Pour les bars (106 individus), la prévalence globale pour les Anisakidae était de 20 % (Figure 75). Elle était plus élevée dans les viscères (18,10 %, Figure 72) que dans les filets (1,89 %, Figure 73). Les bars de cette étude provenaient du golfe du Lion (élevage), du centre et du nord du golfe de Gascogne et de la Manche - Est. Ce résultat est plus faible qu'une autre étude dans laquelle les poissons provenaient de l'océan Atlantique Nord-Est et étaient infestés à 95 % pour les viscères et à 45 % dans les muscles (Bernardi *et al.*, 2011). En 2009, Bernardi a démontré également que la contamination avait un lien avec la taille du bar. La prévalence totale était de 65,27 % pour les bars de 1-2 kg et de 85 % pour ceux de 2-3 kg (Bernardi, 2009). Le poids des bars dans notre étude étaient en moyenne de 535 g. La prévalence globale des parasites dans notre étude était trois fois plus faible que celle des poissons pesant de 1-2 kg dans l'étude de Bernardi sachant qu'il y avait un lot de poisson d'élevage dans notre étude. Une prévalence élevée (76,7 %) sur 300 individus examinés

provenant d'un marché sur la côte égyptienne (mer Méditerranée) (Morsy *et al.*, 2012) a également été rapportée. Enfin, une étude sur un élevage de bars à l'ouest de la mer Méditerranée en Espagne (37.1.1 Baléares) a montré une prévalence nulle des Anisakidae dans 259 poissons par inspection visuelle et digestion pepsique (Peñalver *et al.*, 2010). L'un des trois lots de notre étude (30 bars) provenait d'un élevage situé dans le golfe du Lion (mer Méditerranée), ce qui est proche de la zone d'élevage dans l'étude de Peñalver *et al.*, 2010. Ainsi, l'exposition au risque parasitaire semble maîtrisée durant l'élevage de cette espèce de poisson dans cette région.

- ***Engraulis encrasicolus***

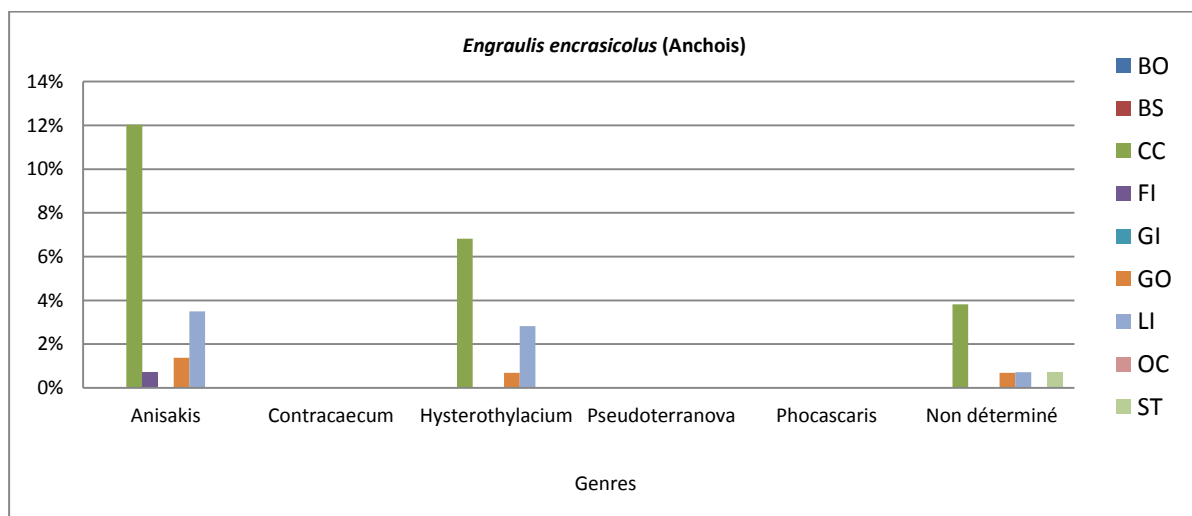


Figure 78 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de l'anchois (*Engraulis encrasicolus*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Chez l'anchois (*Engraulis encrasicolus*), la cavité corporelle était parasitée par *Anisakis* avec une prévalence de $12,03 \pm 5,5$ % et par *Hysterothylacium* à $6,82 \pm 4,3$ %. Dans le foie, *Anisakis* était présent à $3,5 \pm 3$ % et *Hysterothylacium* était présent avec une prévalence de $2,82 \pm 2,7$ %. Dans les gonades, *Anisakis* était présent à $1,38 \pm 1,9$ % et $0,69 \pm 1,3$ % pour *Hysterothylacium*.

La prévalence globale chez les anchois était de 23,26 % (Figure 75) avec 22,48 % pour les viscères (Figure 72) et 0,68 % pour les filets (Figure 73) sur un total de 146 poissons. Les anchois de notre étude provenaient de la Manche Est, du golfe de Gascogne et du golfe du Lion. En comparaison avec l'étude en mer Méditerranée menée sur 396 anchois, la prévalence globale de notre étude était inférieure (23,26 % contre 44,69 %) (Rello *et al.*, 2009). Angellucci *et al.* (2011) ont montré une prévalence de 77 % sur 52 poissons avec 2,4 Anisakidae par poisson en mer de Sardaigne (mer Méditerranée orientale, 37.3.1.) En mer Egée (mer Méditerranée orientale), la prévalence dans l'anchois était de 3,9 % sur 77 poissons (Chaligiannis *et al.*, 2012). Finalement, la prévalence de notre étude reste la plus basse parmi les études réalisées en mer Méditerranée. Selon les différentes

études rapportées en Méditerranée, il existe une grande variabilité de prévalence des Anisakidae au sein d'une espèce de poisson donnée, ce qui est observé pour l'anchois, puisque les données précédentes vont de 3,9 % à 77 %.

- ***Gadus morhua***

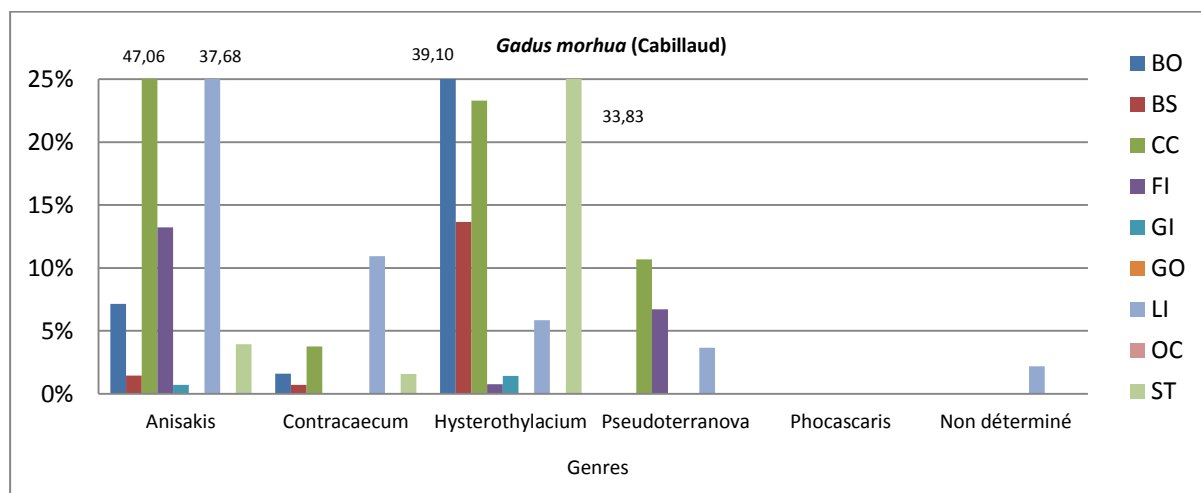


Figure 79 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du cabillaud (*Gadus morhua*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Chez le cabillaud (*Gadus morhua*), *Anisakis* était dominant dans la cavité corporelle, avec une prévalence de $47,06 \pm 8,4$ % suivi par $37,68 \pm 8,1$ % de prévalence dans le foie. *Hysterothylacium* infestait sept localisations corporelles. Pour ce genre, la prévalence était élevée dans l'intestin ($39,10 \pm 8,3$ %) et dans l'estomac ($33,83 \pm 8$ %). *Pseudoterranova* et *Contracaecum* infestaient également trois à cinq localisations corporelles mais avec une prévalence basse (0,72 à 10,95 %). Les filets étaient parasités par *Anisakis* ($13,24 \pm 5,7$ %), *Pseudoterranova* ($6,72 \pm 4,2$ %) et *Hysterothylacium* ($0,75 \pm 1,5$ %).

Les cabillauds provenaient du golfe de Gascogne, du Sud-Ouest de la mer d'Irlande-Est, de la mer Celtique, de la Manche Est et de la mer du Nord. La prévalence globale des Anisakidae chez ces poissons était de 89,13 % (Figure 75) avec plus précisément 86,23 % pour les viscères (Figure 72) et 16,18 % pour les filets (Figure 73). La prévalence était de 34,7 % dans les poissons échantillonnés sur un marché en Belgique (Piccolo *et al.*, 1999). Les cabillauds étudiés dans le lac saint Laurent (Atlantique Nord-ouest) ont montré des prévalences pour *A. simplex* allant de 18,3 % à 88,5 % selon les sous-zones du lac (Boily et Marcogliese, 1995). Notre étude a montré que la prévalence des Anisakidae dans les filets de cabillaud était assez basse par rapport aux autres espèces étudiées (lingue bleu, merlu, lingue franche, *etc...*) en revanche la prévalence globale reste élevée par rapport aux autres études similaires.

- ***Lepidorhombus whiffiagonis***

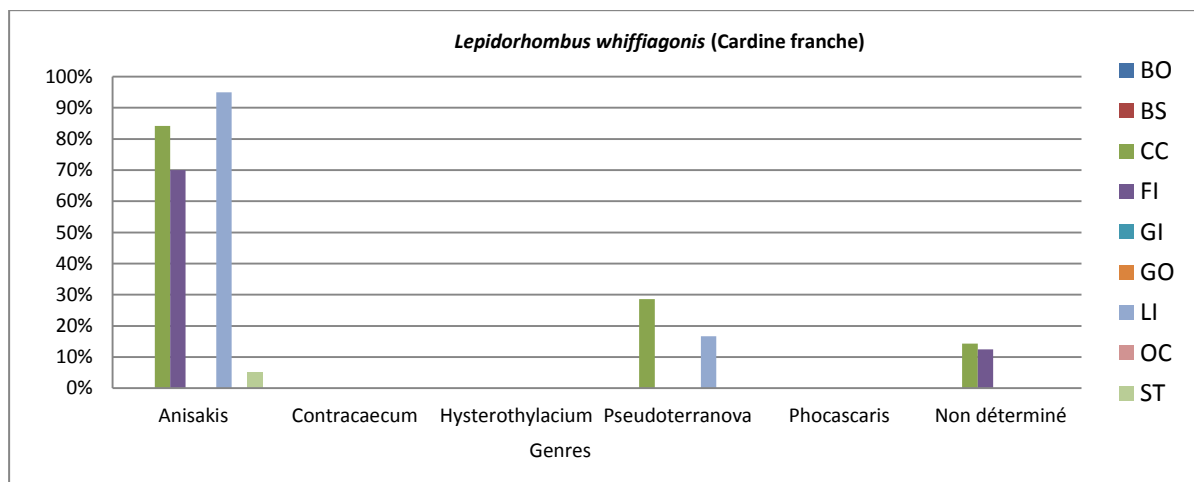


Figure 80 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Chez la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), seuls *Anisakis* et *Pseudoterranova* sont présents. *Anisakis* était présent avec une prévalence de $95 \pm 9,6$ % dans le foie, $84,21 \pm 16,4$ % dans la cavité corporelle et $70 \pm 20,1$ % dans les filets. *Pseudoterranova* infestait la cavité corporelle dans $28,57 \pm 23,7$ % des individus et le foie dans $16,67 \pm 17,2$ % des individus.

La cardine franche est une espèce qui n'était pas prévue dans le plan d'échantillonnage initial. La prévalence dans les viscères (Figure 72) et les filets (Figure 73) étaient respectivement de 95 et 70 %. La prévalence globale était de 95 % (Figure 75) mais l'effectif était très faible (20 individus) par rapport à la lingue bleue dont la prévalence en Anisakidae était élevée mais plus faible que celle de la cardine franche (73,47 %) avec un effectif plus élevé de 94 individus. La prévalence des Anisakidae dans la lingue bleue pourrait être plus forte dû probablement aux viscères manquants. Cette étude apporte les premières données sur cette espèce de poisson en tant qu'hôte d'Anisakidae. Les cardines franches analysées avaient été pêchés en mer Celtique sud (27.VII.h) de l'océan Atlantique Nord-Est. En comparant sa prévalence avec celle des autres espèces de poissons plats, la contamination de la cardine franche est étonnante puisque la sole (provenant de la Manche) et la plie (provenant de la Manche) étaient très peu parasitées par les Anisakidae. Ces 3 espèces provenaient de sous zones géographiques différentes mais proches.

- ***Lophius piscatorius***

La baudroie (*Lophius piscatorius*) était parasitée surtout par *Pseudoterranova* dans les filets ($39,60 \pm 9,5$ %) et par *Anisakis* ($36,27 \pm 9,3$ %). Les filets étaient également contaminés par

Contracaecum mais avec une très faible prévalence. La cavité corporelle était parasitée par *Anisakis* à $26,85 \pm 8,4 \%$ et par *Pseudoterranova* à $21,70 \pm 7,8 \%$.

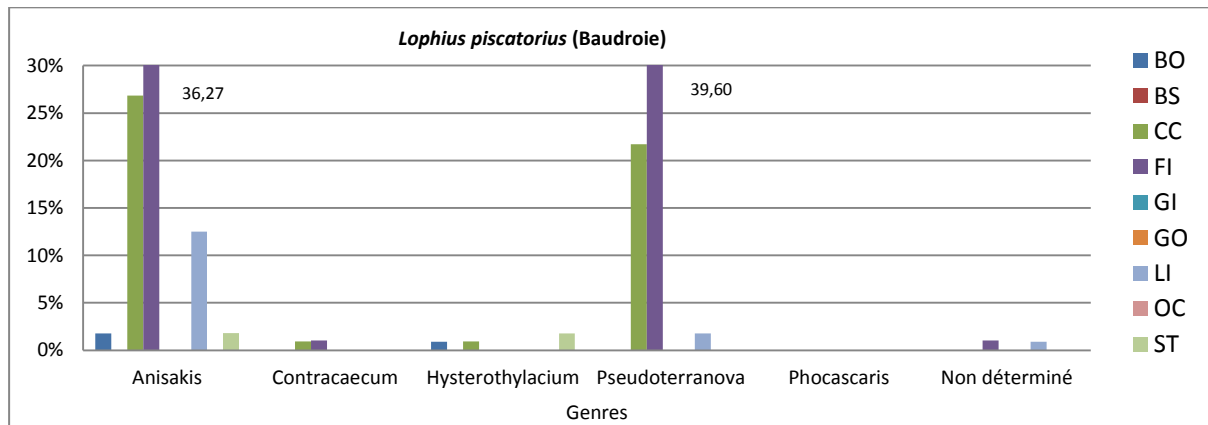


Figure 81 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la baudroie (*Lophius piscatorius*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Cent-treize baudroies provenant de plusieurs sous-zones de pêche (golfe de Gascogne, mer Celtique-sud, sud-ouest d'Irlande-est, Manche-Est, côte nord-ouest de l'Ecosse et nord de l'Irlande et également une zone non précisée de l'Atlantique Nord-Est) étaient infectées globalement à 78,30 % par des Anisakidae (Figure 75) : 45,54 % pour les viscères (Figure 72) en sachant qu'il y avait 2 lots de baudroie éviscérés à bord et 60,95 % pour les filets (Figure 73). Selon l'étude d'Abollo *et al.* (2001), sur 25 baudroies provenant de la côte de Galice (golfe de Gascogne sud), la prévalence était de 24 % pour *A. simplex* dans les filets et 100 % de prévalence globale. Cette zone géographique est proche de la zone dans notre étude. La prévalence d'*Anisakis* dans les filets de notre étude est légèrement plus élevée.

- ***Melanogrammus aeglefinus***

Les Anisakidae contaminaient six localisations corporelles de l'églefin. *Anisakis* était le genre qui contaminait le plus grand nombre de localisations corporelles. La prévalence dans le foie était la plus élevée ($22,31 \pm 7,4 \%$). Les filets étaient parasités majoritairement par *Anisakis* (8,55 %), puis *Pseudoterranova* (1,72 %) et *Hysterothylacium* (0,86 %). L'intestin était parasité par *Hysterothylacium* avec une prévalence de 11,67 %.

La prévalence globale de 121 églefins était de 52,14 % (Figure 75), 47,86 % dans les viscères à (Figure 72) et 10,26 % dans les filets (Figure 73). Une étude sur 308 églefins provenant de la mer du Nord-Nord et Central (27.IV.a et b) montrait un niveau de prévalence à 100 % (Klimpel et Rückert,

2005). La prévalence des 31 églefins provenant de la mer du Nord-Nord de notre étude était de 54,83 %. Il y avait une baisse de prévalence des églefins dans la mer du Nord-Nord.

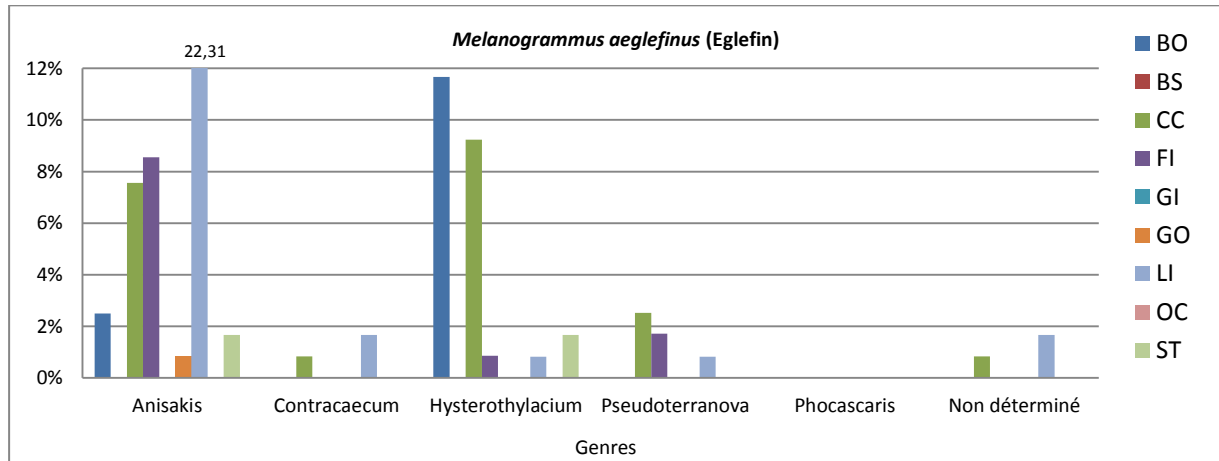


Figure 82 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

- ***Merlangius merlangus***

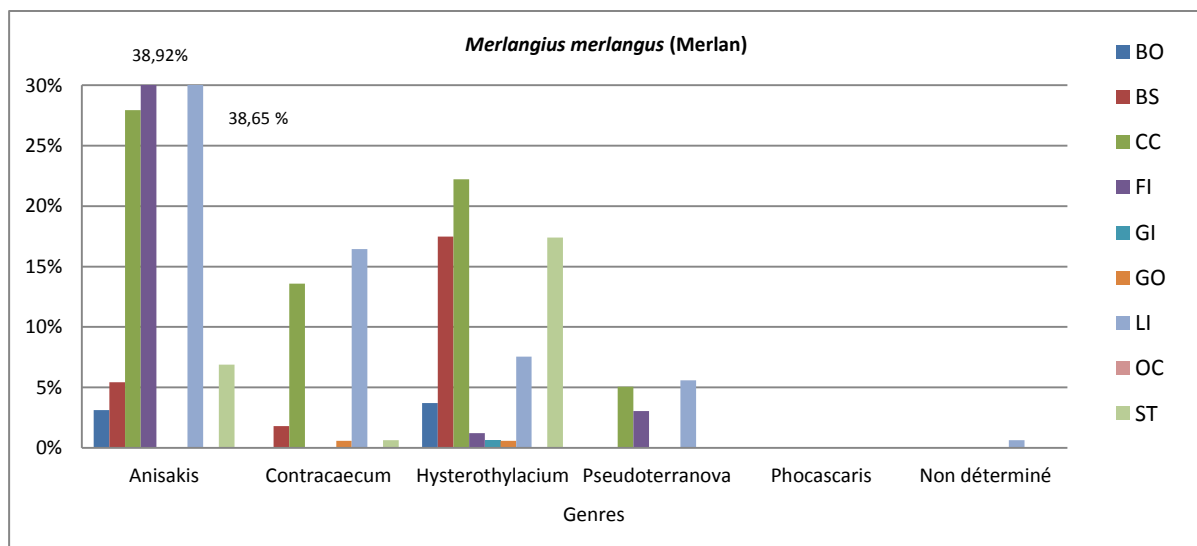


Figure 83 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du merlan (*Merlangius merlangus*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Chez le merlan (*Merlangius merlangus*), parmi les quatre genres présents, *Anisakis* était le genre dominant et était présent à $38,92 \pm 7,4$ % dans les filets, $38,65 \pm 7,5$ % dans le foie et $27,95 \pm 6,9$ % dans la cavité corporelle. Les filets étaient contaminés également par *Hysterothylacium* et *Pseudoterranova* mais avec une prévalence très basse. *Hysterothylacium* était présent dans les 8 localisations corporelles sauf dans la bouche (Figure 83).

Soixante et onze pourcent des 170 merlans provenant de la mer Celtique sud, du golfe de Gascogne, de la Manche Est et du sud de la mer du Nord étaient contaminés par des Anisakidae. Près de 67 % (Figure 84) des poissons étaient contaminés dans leurs viscères et 39,88 % dans les filets (Figure 73). Une autre étude a également montré une forte prévalence dans les filets de merlan provenant de Boulogne-sur-Mer (16 à 81 %), de la côte bretonne, ou du Sud de la mer Celtique (41,67 %) (Chord-Auger *et al.*, 1995). La prévalence rapportée dans l'étude de Chord-Auger *et al.* était très étendue il est donc difficile de la comparer avec nos résultats. Le niveau de prévalence restait assez élevé pour le merlan. Une autre étude a montré que seulement 14,4 % des filets de merlan provenant d'un marché en Belgique étaient infestés (Piccolo *et al.*, 1999). Il convient tout de même de noter que ces données datent déjà d'une vingtaine d'années et la méthode d'observation était la transillumination qui ne permet pas toujours d'observer 100 % des parasites dans les filets.

- ***Merluccius merluccius***

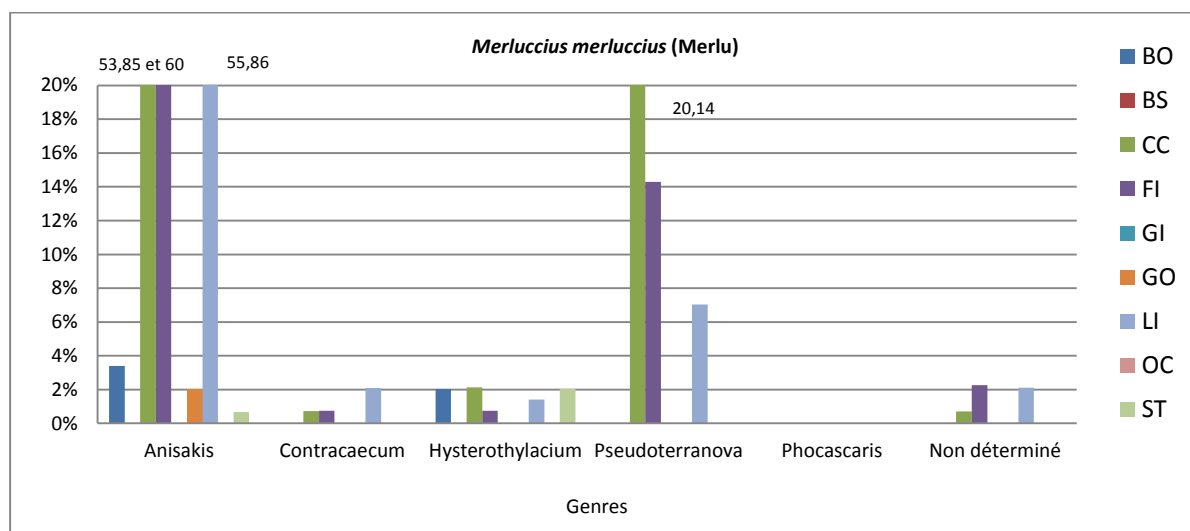


Figure 84 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du merlu (*Merluccius merluccius*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Anisakis était dominant chez le merlu (*Merluccius merluccius*). Il présentait une prévalence de $60 \pm 8,1$ % dans les filets, $53,85 \pm 8,2$ % dans la cavité corporelle et $55,86 \pm 8,1$ % dans le foie. *Pseudoterranova* était en deuxième position après *Anisakis* à la fois dans la cavité corporelle et dans le foie avec, respectivement $20,14 \pm 6,7$ % et $14,29 \pm 5,9$ % de prévalence. *Hysterothylacium* était présent dans 5 localisations corporelles.

Les cent cinquante-deux individus de merlu de l'étude provenaient de toutes les sous-zones du golfe de Gascogne, de la mer Celtique nord et sud, du sud-ouest de l'Irlande-est et du golfe du Lion (mer Méditerranée). La prévalence globale d'infestation par les Anisakidae était de 72,30 % (Figure

75), décomposée en 68 % pour les viscères (Figure 72) et de 60 % pour les filets (Figure 73). Une étude sur 50 merlus de Sardaigne (zone 37.1.3) en mer Méditerranée a montré 62 % de prévalence (Angelucci *et al.*, 2011). Chaligiannis *et al.* (2012) ont montré 66,6 % de prévalence avec 5,9 parasites par poisson sur 215 merlus de la mer Egée de la mer Méditerranée orientale (37.3.1). Une prévalence de 88,57 % sur 35 merlus commercialisés sur le marché parisien a également été rapportée (Huang, 1988). Le résultat de notre étude est en accord avec ceux rapportés dans la littérature, la prévalence chez le merlu est donc élevée en Méditerranée.

- ***Molva dypterygia***

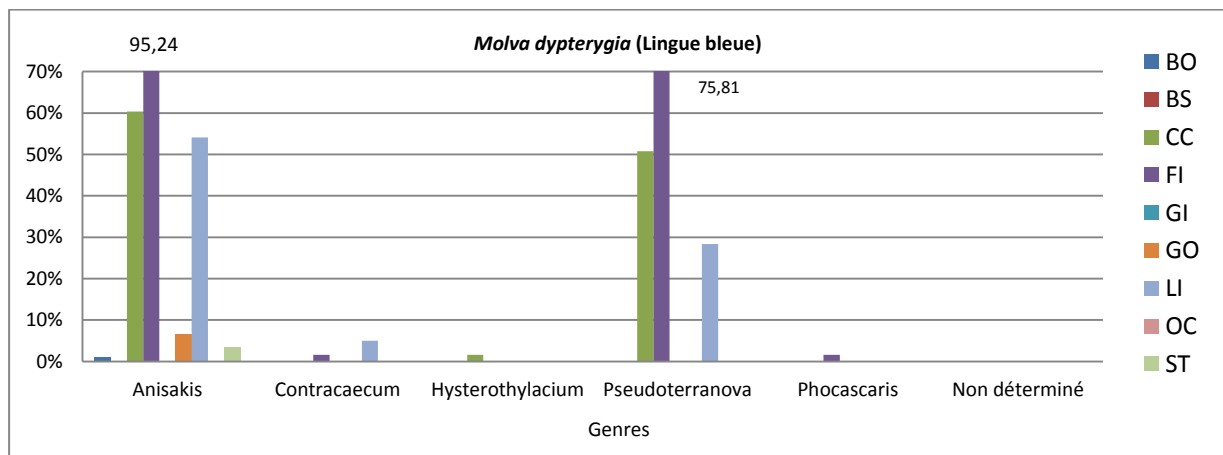


Figure 85 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la lingue bleue (*Molva dypterygia*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

La lingue bleue (*Molva dypterygia*) était contaminée par les cinq genres d'Aniskidés. *Anisakis* et *Pseudoterranova* étaient présents de façon importante chez la lingue bleue dans les filets, la cavité corporelle et le foie. Dans les filets, *Anisakis* était présent avec une prévalence de $95,24 \pm 5,3$ %, $75,81 \pm 10,7$ % pour *Pseudoterranova* et seulement de $1,61 \pm 3,1$ % pour *Contracaecum*. La cavité corporelle était la seconde localisation la plus infestée après les filets notamment par *Anisakis* et *Pseudoterranova*. *Contracaecum*, *Hysterothylacium* et *Phocascaris* étaient également présents mais avec une faible prévalence. *Phocascaris* n'était présent que dans les filets de cette espèce de poisson.

Quatre-vingt quatorze individus de lingue bleue ont été échantillonnés. Deux lots de lingue bleue provenaient des eaux féringiennes et pour le troisième, d'une sous-zone non précisée. C'est une espèce démersale qui se nourrit de crustacées et de poissons tels que les gobies (Gobiidés), de poissons plats et de motelles (*Gaidropsarus* spp.). La prévalence globale des Anisakidae était de 100 % des poissons (Figure 75), la prévalence dans les filets de 100 % (Figure 73), celle dans les viscères de 61,97 % (Figure 72). Il y avait deux lots de lingue bleue dont les viscères ont été enlevés à bord. Une étude sur plusieurs espèces de poisson achetées chez des poissonniers débarqués sur la

côte de Galice (proche du golfe de Gascogne) a montré 100 % de prévalence sur 25 lingues bleues examinées avec une abondance de 4,5 parasites par poisson (Abollo *et al.*, 2001). Les tailles des lingues bleues qui composaient les trois lots échantillonnés dans notre étude étaient supérieures à 95 cm, or il a été montré que ces poissons peuvent accumuler les parasites (Abollo *et al.*, 2001).

- ***Molva molva***

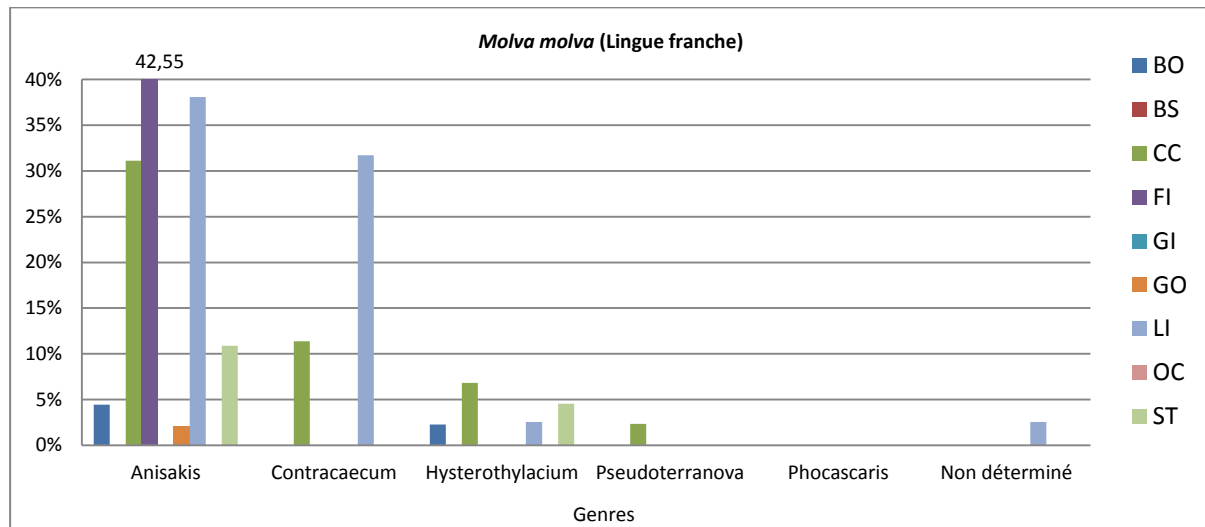


Figure 86 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la lingue franche (*Molva molva*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Anisakis infestait jusqu'à six des localisations corporelles de la lingue franche (*Molva molva*). La prévalence la plus élevée était celle d'*Anisakis* dans les filets ($42,55 \pm 14,1$ %). Après les filets, *Anisakis* était présent de façon importante dans le foie ($38,10 \pm 14,7$ %) et dans la cavité corporelle ($31,11 \pm 13,5$ %). La prévalence de *Contraecaecum* dans le foie était également assez élevée ($31,71 \pm 14,2$ %). L'intervalle de confiance des prévalences chez la lingue franche était assez grand (jusqu'au $14,7$ % à 5 % d'IC), ceci montre une grande variation de prévalence de chaque genre d'Anisakidae dans cette espèce de poisson.

La lingue franche provenant du golfe de Gascogne-sud était globalement contaminée à $88,10$ % (Figure 75), $76,19$ % dans les viscères (Figure 72) et $42,55$ % dans les filets (Figure 73) pour 48 individus étudiés. Une seule étude a rapporté une prévalence de $1,3$ % sur 79 filets provenant de l'Atlantique Nord-Est (Piccolo *et al.*, 1999). Il y a donc une très grande différence de contamination, cependant la méthode d'isolation des parasites faisait appel à une table de mirage, dans l'étude de Piccolo *et al.* cette méthode est connue pour son manque de sensibilité.

- ***Pleuronectes platessa***

Le lot de 32 plies étudiées (*Pleuronectes platessa*) provenait de la Manche Est. Aucun poisson n'était contaminé par des Anisakidae. Jusqu'à ce jour, aucune autre étude portant sur ces parasites n'a été rapportée concernant les plies. Si l'on compare ce résultat aux autres espèces de poisson plat collectées pour notre étude, on note que la sole était très peu infectée et la plie n'était pas du tout parasitée. Ces poissons plats sont tout de même susceptibles d'être infectés par les Anisakidae comme le montre l'étude sur la sole du Sénégal (Marques *et al.*, 2006). De plus, la cardine franche de notre étude était fortement parasitée puisque 70 % des filets et 95% des viscères étaient parasités pour cette espèce.

- ***Pollachius virens***

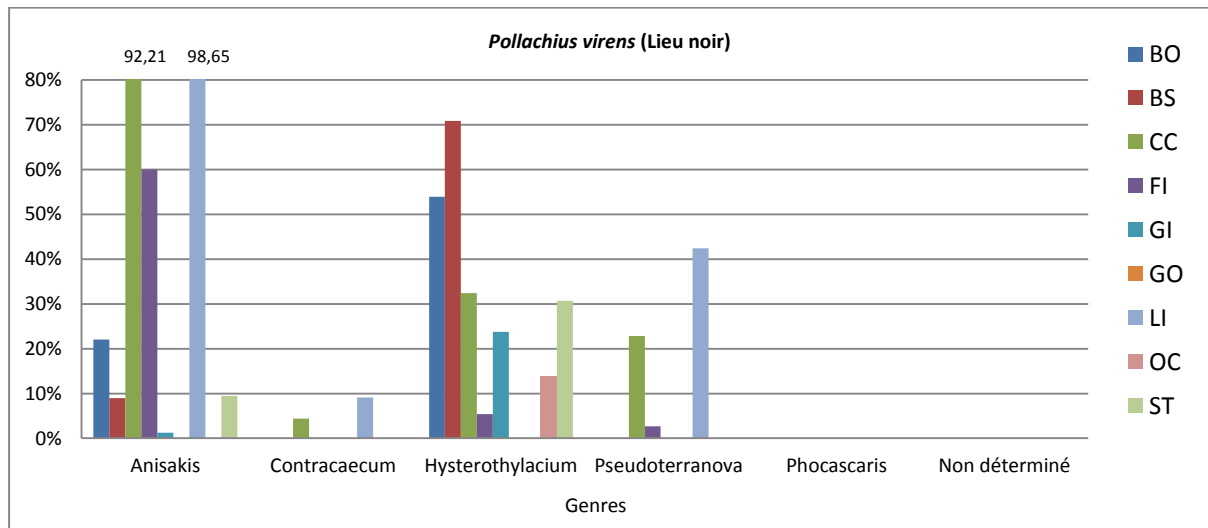


Figure 87 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du lieu noir (*Pollachius virens*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Anisakis et *Hysterothylacium* parasitaient le même nombre de localisations corporelles (7). La prévalence d'*Anisakis* restait la plus élevée dans le foie ($98,65 \pm 2,6$ %) et dans la cavité corporelle ($92,21 \pm 6$ %). *Hysterothylacium* présentait une prévalence importante sur la surface corporelle ($70,89 \pm 10$ %). La prévalence la plus élevée de *Pseudoterranova* était dans le foie ($42,42 \pm 11,9$ %). Au niveau des filets, *Anisakis* infestait également avec la prévalence la plus importante ($60 \pm 11,1$ %). *Hysterothylacium* et *Pseudoterranova* étaient également présents dans les filets mais avec une faible prévalence (Figure 87).

Le lieu noir (*Pollachius virens*, 81 individus) provenant de la mer Celtique et de la mer du Nord était globalement infecté à 100 % (Figure 75). Plus spécifiquement, 100 % des viscères étaient infestés (Figure 72) et 62,67 % des filets (Figure 73). Une autre étude a montré des prévalences plus

faibles en Anisakidae dans les filets de lieu noir prélevés à Boulogne-sur-Mer et Nantes : 34 et 48 %, respectivement (Chord-Auger *et al.*, 1995). Mais l'étude a été effectuée à l'aide d'une table de mirage, or cette méthode n'est efficace que lorsque la chair de poisson est claire (Huang, 1988). Il est possible que tous les parasites n'aient pas été observés. Une autre étude a montré une prévalence de 26,7 % dans des filets achetés sur le marché parisien et provenant de l'océan Atlantique Nord-Est (Piccolo *et al.*, 1999). Klimpel *et al.* (2004) ont montré que le lieu noir était parasité à 100 % dans le Nord de la mer du Nord par *A. simplex*, ce qui est en concordance avec la prévalence globale de notre étude au Nord de la mer du Nord. En plus d'*A. simplex*, *A. pegreffii*, *A. physeteris*, *Anisakis* sp., *H. aduncum*, *P. krabbei*, *C. osculatum* et *C. rudolphii* ont été également identifiés dans le lieu noir durant notre étude. En revanche, une étude a montré une prévalence nulle sur 25 lieux noirs prélevés en Sardaigne (mer Méditerranée orientale, (Abollo *et al.*, 2001). Ceci montre des variations importantes du niveau de contamination du lieu noir entre l'océan Atlantique et la mer Méditerranée.

- ***Salmo salar***

Les 40 individus de saumon Atlantique (*Salmo salar*) étaient issus d'un élevage des eaux norvégiennes. Sur 40 poissons étudiés aucun n'était parasité par les Anisakidae. Dans une étude ancienne, aucun parasite n'avait été trouvé dans 3 700 filets de saumon Atlantique provenant de fermes d'élevage en Norvège et Ecosse analysés sur table de mirage par Angot et Brasseur (1993). En revanche, une autre étude sur le saumon en élevage extensif en mer a montré que sur 50 poissons étudiés, 20 % des individus étaient contaminés mais leur niveau de qualité n'est pas suffisant pour qu'ils soient destinés à la consommation humaine. Sur cinquante saumons provenant du même élevage et dont la qualité était suffisante pour la consommation humaine, aucun poisson n'était parasité (Mo *et al.*, 2014). Une autre étude sur les saumons d'élevage a également montré une prévalence nulle pour les saumons Atlantiques provenant d'élevages en Ecosse (Wootten *et al.*, 2010).

- ***Sardina pilchardus***

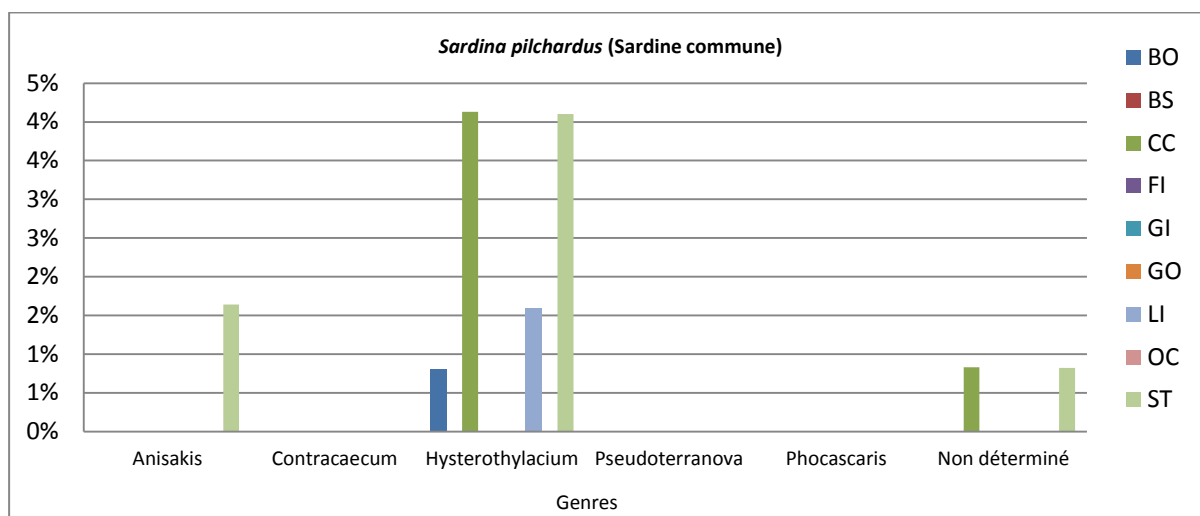


Figure 88 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la sardine commune (*Sardina pilchardus*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Chez la sardine commune (*Sardina pilchardus*), quatre localisations corporelles seulement étaient infectées par des Anisakidae. *Hysterothylacium* infestait quatre localisations et présentait la prévalence la plus élevée au niveau de la cavité corporelle ($4,13 \pm 3,5$ %) et dans l'estomac ($4,10 \pm 3,5$ %).

Les 126 individus de sardine commune provenaient de la Manche Est, du golfe de Gascogne et du golfe du Lion. La prévalence globale et la prévalence dans les viscères étaient les mêmes et s'élevaient à 11,48 % (Figure 75 et 72). En revanche, la prévalence dans les filets était nulle. Une étude sur les sardines méditerranéennes a montré une prévalence de 18 % dont 1,18 % dans les filets sur 85 poissons étudiés (Pulleiro-Potel *et al.*, 2015). Dans une autre étude, 5,5 % de prévalence a été observée avec 0,05 Anisakidae par poisson sur les 36 poissons étudiés provenant de la mer Egée (Chaligiannis *et al.*, 2012). La présente étude confirme donc que la sardine semble être une espèce très peu infectée dans les muscles.

- ***Scomber japonicus***

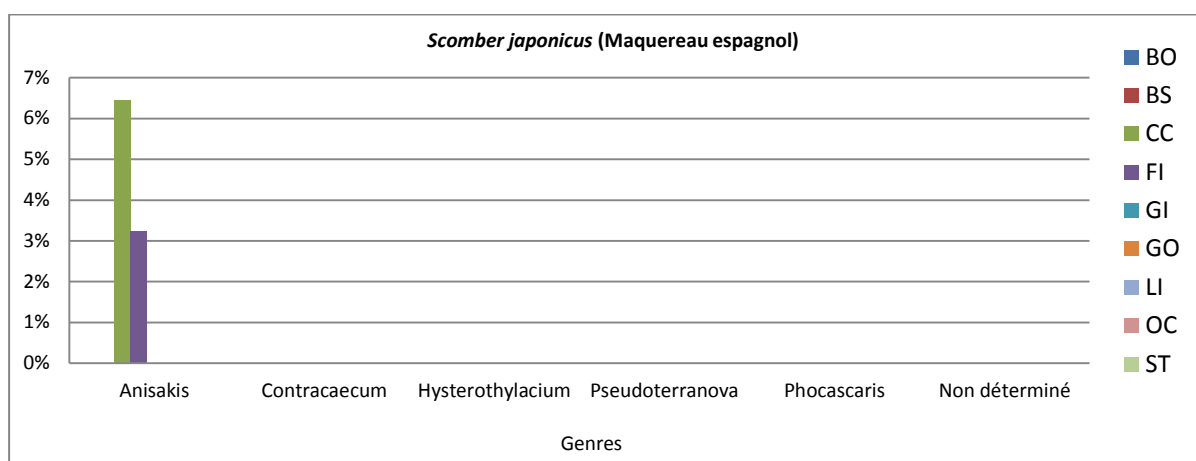


Figure 89 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du maquereau espagnol (*Scomber japonicus*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

Seul *Anisakis* a été identifié chez le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*). La prévalence d'*Anisakis* dans la cavité corporelle était de $6,45 \pm 8,6$ % et de $3,23 \pm 6,2$ % dans les filets.

Les 31 individus de maquereau espagnol ont été pêchés dans le golfe du Lion en mer Méditerranée. La prévalence globale des Anisakidae était de 9,68 % (Figure 75), 6,45 % dans les viscères (Figure 72) et 3,23 % dans les filets (Figure 73). Une autre étude sur cette espèce de poisson a montré une prévalence plus basse en mer Méditerranée (57,0 % sur 135 spécimens) que dans l'océan Atlantique Nord-Est (67,9 % sur 131 spécimens) (Abattouy *et al.*, 2011). En mer Egée, les maquereaux espagnols étaient contaminés à 100 % sur 10 poissons étudiés (Pekmezci *et al.*, 2014). En comparant la prévalence entre les maquereaux espagnols en mer Méditerranée, le lot de notre étude issu du golfe du Lion (31 poissons) présentait une valeur beaucoup plus basse qu'en mer Egée, une zone proche, mais l'effectif était relativement faible.

- ***Scomber scombrus***

Le maquereau commun (*Scomber scombrus*) était infecté dans cinq localisations corporelles. *Anisakis* infestait, sur ces localisations, principalement la cavité corporelle avec une prévalence de $44,74 \pm 9,1$ %. Les filets étaient parasités par *Anisakis* ($17,50 \pm 6,8$ %), par *Hysterothylacium* ($0,83 \pm 1,6$ %) et également par des nématodes non déterminés ($3,33 \pm 3,2$ %).

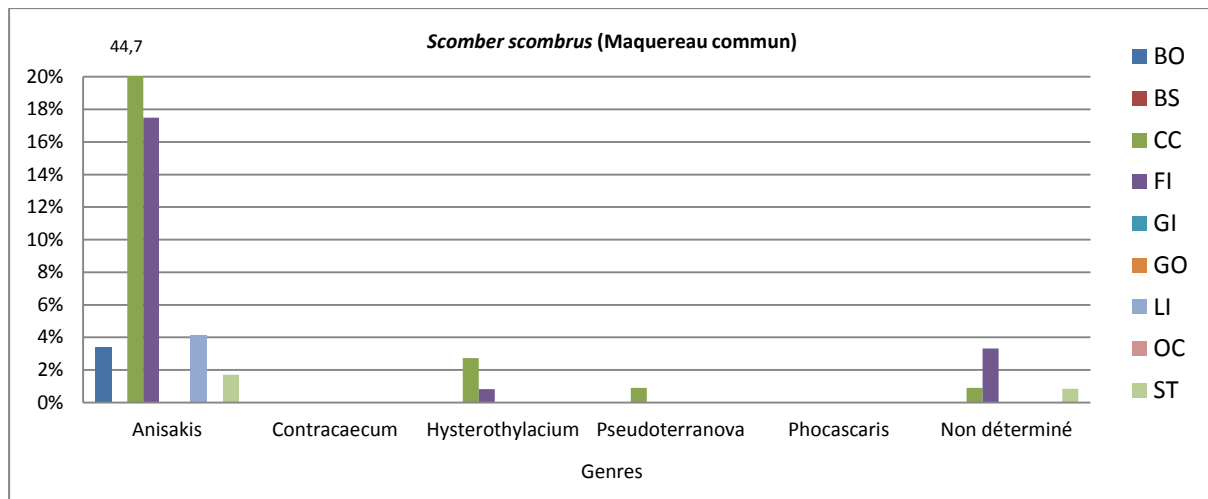


Figure 90 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles du maquereau commun (*Scomber scombrus*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

La prévalence globale chez le maquereau commun était de 54,39 % (Figure 75), 50 % dans les viscères (Figure 72) et 19,17 % dans les filets (Figure 73). Ces maquereaux communs provenaient du golfe de Gascogne, de la Manche Est et du golfe du Lion. Un travail a montré 100 % de prévalence (sur cinq poissons) de la mer Egée avec 14 Anisakidae par poisson (Chaligiannis *et al.*, 2012). Une autre étude a montré une prévalence de 77,8 % en mer de Sardaigne (mer Méditerranée orientale) sur neuf poissons avec 0,22 Anisakidae par poisson en abondance moyenne (Angelucci *et al.*, 2011). Une étude sur le maquereau commun du nord de la mer du Nord a trouvé une prévalence de 1,69 % dans les filets et de 89,7 % dans les viscères dans un lot de 78 poissons (Levsen *et al.*, 2005). D'après la littérature, les chiffres de prévalence des Anisakidae dans les filets de maquereau commun sont donc plus bas en mer du Nord que ceux de notre étude. Par contre, en termes de prévalence globale, le chiffre rapporté dans notre étude est inférieur à ceux obtenus dans les autres études.

- ***Solea solea***

La sole (*Solea solea*) n'est parasitée que par *Hysterothylacium* dans l'intestin ($1,89 \pm 2,6$ %) et dans l'estomac ($0,96 \pm 1,9$ %).

La sole présentait une prévalence globale (Figure 75) et une prévalence des viscères (Figure 72) identiques d'une valeur de 2,86 % alors que la prévalence dans les filets était nulle (Figure 73). Ces données concernent un lot pêché au sud de la mer du Nord. Pour le lot provenant de la Manche Est, aucun Anisakidae n'a été trouvé. A ce jour, aucune étude de prévalence des Anisakidae n'a été publiée sur la sole commune. Une seule étude concernant la sole du Sénégal (*Solea senegalensis*) a montré 1,3 % de prévalence des Anisakidae sur 80 individus analysés provenant de l'océan

d'Atlantique au large du Portugal (Marques *et al.*, 2006). La sole est parmi les espèces de notre étude les moins infectées par les Anisakidae

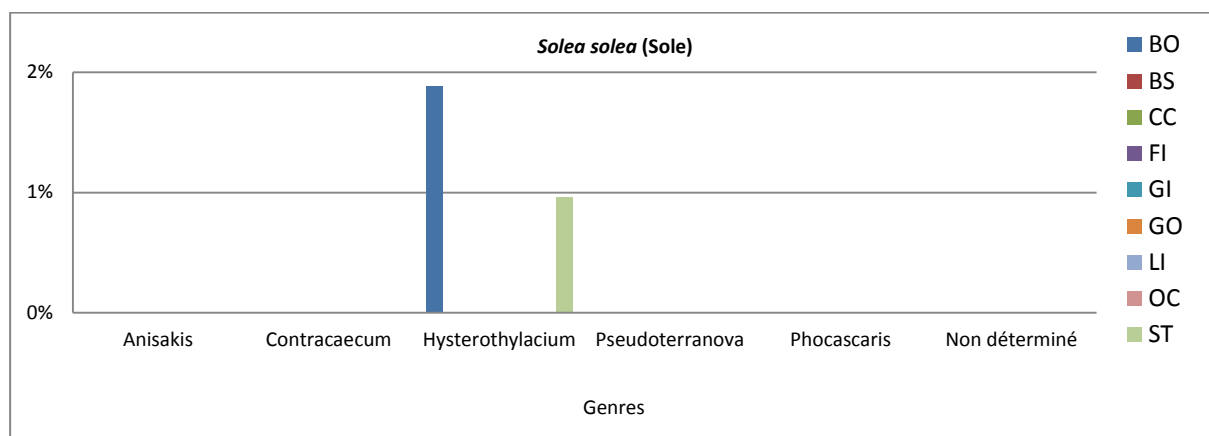


Figure 91 : Prévalence des différents genres d'Anisakidae présents dans les différentes localisations corporelles de la sole (*Solea solea*).

BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac. Intervalle de confiance (IC) à 95 %

III.4.6. Prévalence d'Anisakis et de Pseudoterranova dans les 16 espèces de poissons par zone de pêche

Dans cette partie, les résultats concernant les deux genres de parasites les plus impliqués en pathologie humaine ont été choisis pour présenter leur prévalence (avec la valeur d'écart type) dans les filets et la cavité corporelle en fonction de zones géographiques.

La Figure 92 et l'Annexe 11 illustre la prévalence d'*Anisakis* dans les filets des 18 espèces de poissons. Selon la carte, il y avait environ cinq espèces dont la prévalence en *Anisakis* était élevée. Mais chaque espèce de poisson n'a pas été échantillonnée de façon équivalente pour les raisons indiquées précédemment (*risk-ranking*, budget et temps disponibles, disponibilité des poissons). Le résultat est présenté dans l'ordre d'alphabétique du nom latin des poissons.

Pour le hareng (*Clupea harengus*) provenant de la mer du Nord (27.V), les filets des 22 harengs de la division mer du Nord centrale (27.IV.b) n'étaient pas infectés. En revanche, les sept harengs de la zone mer du Nord-Sud (27.IV.c) étaient parasités à $14,29 \pm 13,23$ %. Dans une sous zone proche, Manche Est (27.VII.d), les 31 harengs étaient parasités à $27,81 \pm 7,86$ % dans les filets. En comparant avec une étude faite par Levsen *et al.* en 2005 (0,74 % dans les filets), la prévalence d'*Anisakis* dans les filets de notre étude est plus élevée.

Parmi les bars communs (*Dicentrarchus labrax*, blanc rayé noir et gris), seuls les bars de Manche Est (27.VII.d) étaient parasités ($14,29 \pm 13,23$ %). Les bars du golfe de Gascogne (27.VIII.a) et de la mer Méditerranée (issus de l'élevage) n'étaient pas parasités par *Anisakis* dans les filets. Une étude a

rapporté 45 % d'Anisakidae dans les muscles (Bernardi *et al.*, 2011). Les données ne sont pas comparables pour les poissons d'élevage et sauvage car les conditions de vie sont différentes.

Les cinq anchois (*Engraulis encrasicolus*, vert avec points) avaient une prévalence de $20 \pm 17,79\%$ pour la zone golfe de Gascogne Nord (27.VIII.a). Pour cette espèce de poisson, la prévalence est souvent exprimée sous le terme « Anisakidae », cependant cette dénomination rapportée dans la littérature ne permet pas de savoir s'il s'agit plus précisément d'infection par *Anisakis* dans les filets. Ce pendant le nombre d'anchois que nous avons échantillonnés dans cette zone de pêche était faible sachant que les anchois des autres zones échantillonnées n'étaient pas parasités.

Les cabillauds (*Gadus morhua*, en bleu pâle) étaient plus parasités vers la mer d'Irlande, Ouest de l'Irlande, Porcupine Bank, Manche orientale et occidentale, canal de Bristol, mer Celtique septentrionale et méridionale, et sud-ouest de l'Irlande - Est et Ouest (27.VII) que pour la sous zone mer du Nord (27.IV). Ainsi, les prévalences de la sous zone 27.VII étaient de $11,11 \pm 10,48$ à 100 % alors que pour la sous zone 27.IV elles étaient de $3,23 \pm 2,24$ % à 12,50 %. Un cabillaud issu du golfe de Gascogne Nord n'était pas parasité par *Anisakis*. En revanche la prévalence de la zone 27.VII était très variée ($11,11 \pm 10,48$ à 100 %). La prévalence d'*Anisakis simplex* dans les filets étudiés par Bratney dans la région de Terre-Neuve montrait une prévalence de 9,85 à 66,82 % dans 12 207 cabillauds achetés au marché local et pêchés en océan Atlantique (Bratney et Bishop, 1992). Ceci confirme une forte variabilité de la prévalence d'*Anisakis* chez le cabillaud.

Les cardines franches (*Lepidorhombus whiffiagonis*, en rose pâle) provenant de la mer Celtique Sud (27.VII.h) étaient parasitées à $70 \pm 10,25$ %. Ce poisson plat était très infecté par *Anisakis* par rapport aux autres poissons plats.

Dans la même sous zone 27.VII, les prévalences de la baudroie (*Lophius piscatorius*, bâton en vert pale) étaient assez élevées avec des écart-types importants (27.VII.j : $52,94 \pm 12,11$ %, 27.VII.h : $60 \pm 21,91$ %, 27.VII.g : $66,67 \pm 15,71$ %), seule la baudroie provenant de la division 27.VII.d avait une prévalence nulle mais il ne s'agissait que d'un poisson. Dans la sous zone voisine (27.VIII), les trois baudroies de la division 27.VIII.b présentait une prévalence nulle contrairement aux 14 baudroies du golfe de Gascogne-nord (27.VIII.a) dont la prévalence était de $35,71 \pm 12,18$ % puis les trois baudroies de la division golfe de Gascogne-large (27.VIII.d) présentaient une prévalence de $66,67 \pm 27,22$ %. En revanche Abollo *et al.* (2001) avait rapporté une prévalence plus faible pour *Anisakis simplex* (24 %) dans les filets.

L'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*, orange pale) était également moyennement parasité mais avec une prévalence plus basse que celle du maquereau commun, cependant plusieurs zones étaient contaminées. Les églefins de la mer du Nord - Nord étaient parasités à $12,90 \pm 6,02$ %, ceux de la mer

Celtique-Nord (27.VII.g) à $14,29 \pm 13,23$ %, ceux de la mer Celtique Sud (27.VII.h) à $25 \pm 21,65$ %, ceux du Sud-Ouest de l'Irlande-Est à $25 \pm 15,31$ %, au golfe de Gascogne Nord (27.VIII.a) à $12,5 \pm 8,27$ %. Les églefins de la Manche Est (27.VII.d) et du golfe de Gascogne large (27.VIII.d) n'étaient pas contaminés par *Anisakis* dans les filets.

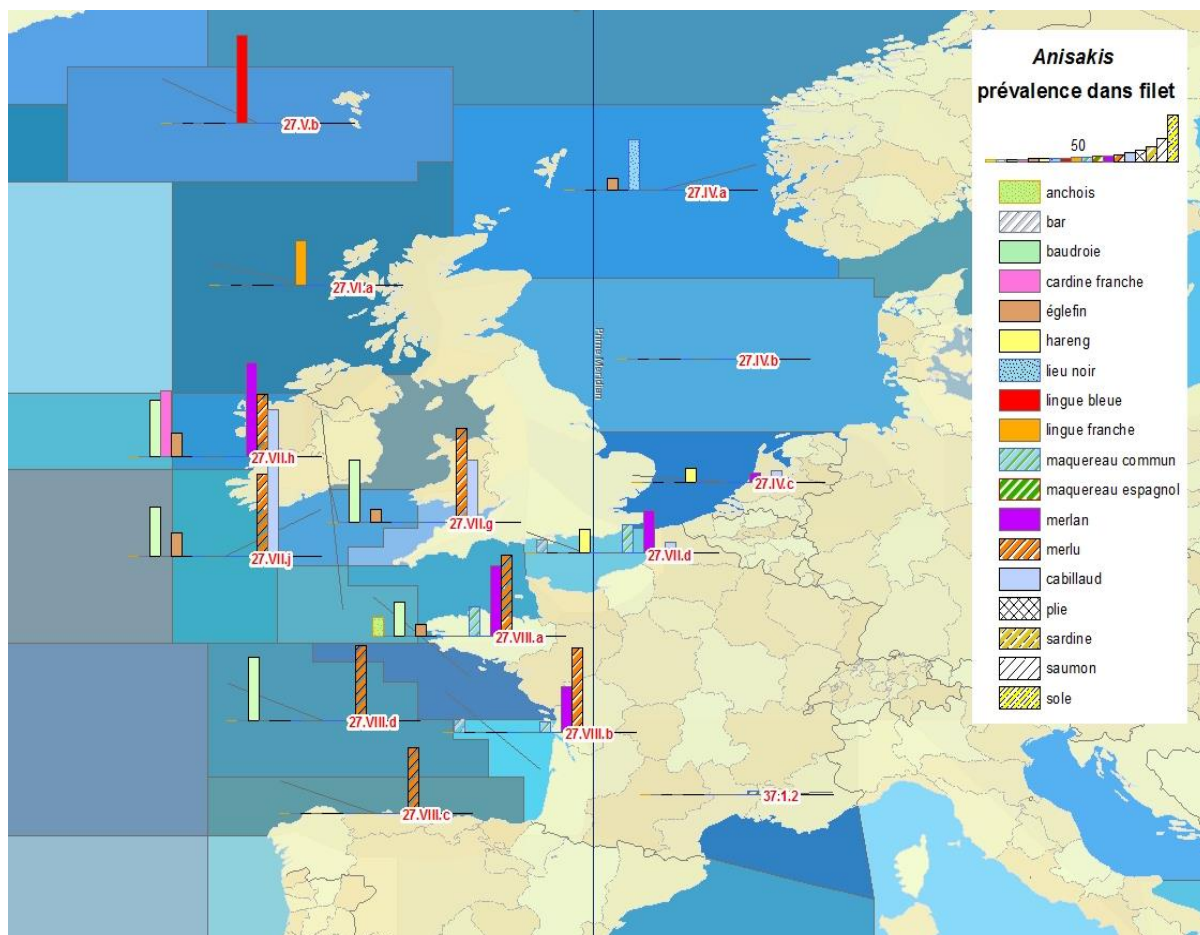


Figure 92 : Carte de prévalence d'*Anisakis* dans les filets des 1 768 poissons.

Les trois merlans (*Merlangius merlangus*, bâton rose fuschia) provenant de la sous-zone mer du Nord centrale (27.IV.b) n'étaient pas parasités, mais les dix merlans de la mer du Nord - Sud étaient parasités à $10 \pm 9,49$ %. Les merlans de la sous zone mer d'Irlande et ses environs (27.VII) étaient parasités à $44,93 \pm 5,99$ % (69 merlans, Manche Est : 27.VII.d) et à 100 % (un merlan, mer Celtique Sud : 27.VII.h). Pour la sous zone golfe de Gascogne (27.VIII), les quatre merlans du Nord de golfe de Gascogne étaient parasités à $75 \pm 21,65$ % et les 50 merlans du golfe de Gascogne central (27.VIII.b) à $48 \pm 7,07$ %.

Le merlu (*Merluccius merluccius*, représenté par un bâton en orange rayé) provenant de la sous-zone 27.VII (Mer d'Irlande, ouest de l'Irlande, Porcupine Bank, Manche orientale et occidentale, canal de Bristol, mer Celtique Nord et Sud, et sud-ouest de l'Irlande – est et ouest) montre une prévalence

allant de $66,67 \pm 19,25$ % à 100 %. La prévalence chez le merlu provenant d'une zone proche telle que le golfe de Gascogne (27.VIII) était également élevée ($70 \pm 14,49$ % à $90 \pm 5,48$ %).

La lingue bleue (*Molva dypterygia*, en rouge) provenant des eaux féringiennes était parasitée par *Anisakis* dans les filets à $94 \pm 3,36$ %.

Pour la lingue bleue et la cardine franche, la prévalence d'*Anisakis* dans les filets n'a jamais rapportée auparavant. Nos résultats montrent une prévalence élevée.

Seuls les lieus noirs (*Pollachius virens*, pointillés noirs) provenant de la mer du Nord-Nord étaient parasités par *Anisakis* dans les filets ($54,35 \pm 7,34$ %) et une prévalence nulle a été observée pour le lieu noir pêché dans la mer Celtique Sud (27.VII.h).

La sardine (*Sardina pilchardus*), le saumon d'Atlantique (*Salmo salar*), la plie (*Pleuronectes platessa*) et la sole (*Solea solea*) étaient exempts d'*Anisakis* dans les filets.

Les maquereaux communs (*Scomber scombrus*, bleu pâle rayé vert) étaient moyennement parasités. Dans la Manche Est (27.VII.d), 31 maquereaux étaient parasités à $30,43 \pm 9,59$ %. Dans le golfe de Gascogne Nord la prévalence moyenne était de $31,43 \pm 21,65$ %. Dans le golfe de Gascogne central (27.VIII.b), ils étaient parasités à $10,34 \pm 5,66$ %. Les maquereaux communs de la mer Méditerranée n'étaient pas parasités par *Anisakis*. Les maquereaux communs étaient parasités de façon équivalente à un taux moyen parmi les zones de pêche de l'océan Atlantique Nord-Est.

Les intervalles de confiance importants montrent qu'il y a une forte variabilité de l'infestation par *Anisakis* entre individus au sein d'une même espèce pour l'anchois, le bar, l'églefin, le maquereau commun, le cabillaud, le merlan et le hareng dans certaines sous zones de pêche.

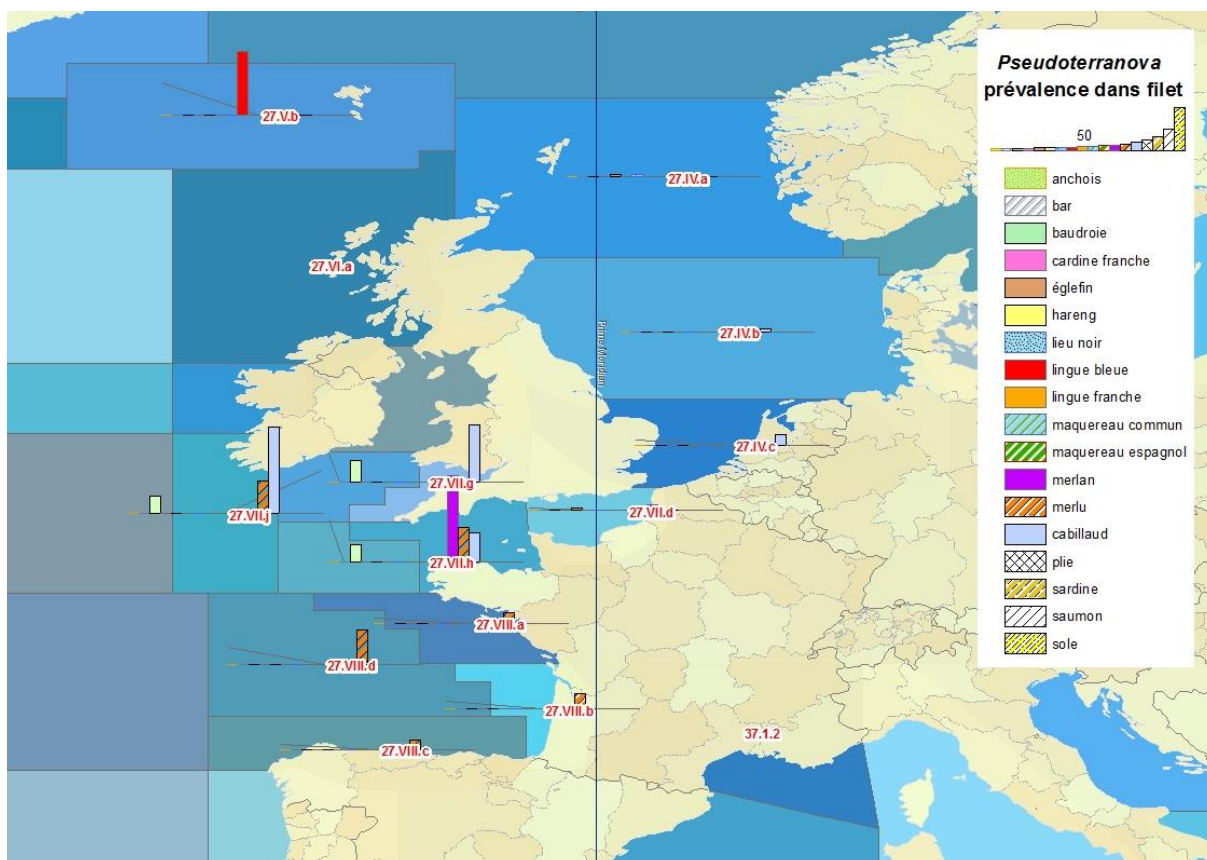


Figure 93 : Carte de prévalence de *Pseudoterranova* dans les filets de 1 768 poissons.

Les filets des 1768 poissons étaient nettement moins parasités par *Pseudoterranova* (Figure 93). La lingue bleue (*Molva dypterygia*, en rouge) des eaux Féringiennes (27.V.b) était parasitée à un taux moyen de $74 \pm 6,20$ %.

Le merlan (*Merlangius merlangus*, rose) était peu parasité par *Pseudoterranova*. Deux zones étaient contaminées : 67 merlans de la Manche est (27.VII.d) ont montré une prévalence moyenne de $5,97 \pm 2,89$ % et 100 % de prévalence ont été observés pour la mer Celtique Sud (27.VII.h), néanmoins seul un individu y a été échantillonné.

Les cabillauds (*Gadus morhua*, bleu pâle) de la Manche Est (27.VII.d) et du golfe de Gascogne-Nord (27.VIII.a) avaient une prévalence nulle pour *Pseudoterranova* mais les effectifs n'étaient que de 10 poissons. Pour le cabillaud de la zone mer d'Irlande, ouest de l'Irlande, Porcupine Bank, Manche orientale et occidentale, canal de Bristol, mer Celtique septentrionale et méridionale, et sud-ouest de l'Irlande - est et ouest (27.VII), la prévalence paraît élevée : 100 % pour la zone Sud - Ouest de l'Irlande-Est (27.VII.j), $66,67 \pm 27,22$ % en mer Celtique-Nord (27.VII.g), $33,33 \pm 19,25$ % en mer Celtique Sud (27.VII.h), ceci peut être expliqué par les faibles effectifs étudiés respectivement de 1, 3 et 6 cabillauds par zone. Huit cabillauds de la mer du Nord –Sud (27.IV.c) étaient parasités à

12,50 ± 11,69 %. Soixante-deux cabillauds de la zone voisine, mer du Nord-Central (27.IV.b), étaient parasités à 3,23 ± 2,24 %. Les cabillauds de Nord-Ouest de l'océan d'Atlantique (Canada, (McClelland et Marcogliese, 1994) étaient parasités à 97 % par *Pseudoterranova* dans les filets. Cette prévalence était très élevée par rapport aux résultats des cabillauds de l'océan Atlantique Nord Est de notre étude.

Les merlus (*Merluccius merluccius*, orangé rayé) de la zone mer Celtique Nord (27.VII.g) et de la mer Méditerranée étaient exempts de *Pseudoterranova* dans les filets. La prévalence des merlus parasités était de 11,11 % pour le golfe de Gascogne-Sud (27.VIII.c), de 12 ± 6,50 % pour le golfe Gascogne - nord (27.VIII.a), de 17,86 ± 7,24 % pour le golfe de Gascogne - central (27.VIII.b), de 37,50 ± 12,10 % pour le Sud-ouest de l'Irlande-Est (27.VII.j) et de 40 % pour la mer Celtique-Sud (27.VII.h) et le golfe de Gascogne-large (27.VIII.d).

Les baudroies (*Lophius piscatorius*, vert pâle) des zones Manche Est (27.VII.d), golfe de Gascogne - nord (27.VIII.a), golfe de Gascogne - central (27.VIII.b) et golfe de Gascogne - large (27.VIII.d) étaient exemptes de *Pseudoterranova* dans les filets. Les baudroies de la mer Celtique-Nord (27.VII.g) étaient parasitées à hauteur de 25 ± 15,31 %, 20 ± 17,89 % pour la mer Celtique Sud (27.VII.h), 20 ± 10,33 % et au Sud-ouest de l'Irlande-Est (27.VII.j) et enfin 11,11 ± 10,48 % pour le golfe de Gascogne - Sud.

Pour l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*, orange pâle) la prévalence moyenne était de 3,23 ± 3,17 % en mer du Nord-Nord et de 2,22 ± 2,20 % pour la Manche Est (27.VII.d).

Les lieus noirs (*Pollachius virens*, pointillés noirs) provenant de la mer du Nord-Nord étaient parasités à 2,17 ± 2,15 %.

Les autres espèces de poisson étaient exemptes de *Pseudoterranova* dans les filets.

Finalement, les espèces pour lesquelles la prévalence globale est importante pour *Anisakis* et *Pseudoterranova* sont les mêmes au sein des différentes zones de pêche étudiées : c'est le cas de la lingue bleue, du merlu, du merlan, de la baudroie et du cabillaud. Certaines espèces de poisson ont pour certaines zones de pêche un nombre d'individus faible avec une prévalence importante allant jusqu'à 100 % de poissons contaminés ; ces données ont besoin d'être précisées en utilisant un échantillonnage plus conséquent. Il y a également une forte variabilité de l'infestation par *Pseudoterranova* au sein d'une même espèce de poisson dans certaines sous zones de pêche mise en évidence par un grand intervalle de confiance chez le merlu, le cabillaud et la baudroie.

Ces deux cartes ont permis d'observer qu'*Anisakis* était très présent en terme de prévalence, dans une grande variété d'hôtes (merlu, lingue bleue, merlan, hareng et baudroie) et dans plusieurs sous

zones de pêche. Pour *Pseudoterranova*, il est évident que ce genre infectait moins intensément les poissons, avec des prévalences plus faibles et dans une diversité d'hôtes moindre.

III.5. Intensité du parasitisme par les Anisakidae

Au total, 15 912 localisations corporelles de poisson ont été étudiées provenant de 1 768 poissons. 13 578 (85,33 %) localisations corporelles n'étaient pas contaminées. 1 749 (10,99 %) localisations corporelles étaient contaminées et les Anisakidae isolés ont été identifiés au niveau du genre et de l'espèce. Pour le reste, 585 (3,68 %) localisations corporelles étaient contaminées mais les nématodes n'ont pas été identifiés et ces échantillons ont donc été exclus de l'analyse. Ici, les termes d'intensité et d'intensité moyenne seront utilisés. L'intensité correspond au nombre d'individus parasites présents dans ou sur un hôte unique infecté, alors que l'intensité moyenne correspond au nombre total d'individus d'un taxon parasite divisé par le nombre total d'hôtes infectés. Le calcul d'intensité est décrit dans l'Annexe 12.

III.5.1. Nombre d'Anisakidae de chaque genre identifiés dans les espèces de poisson

Anisakis était largement majoritaire par rapport aux autres espèces d'Anisakidae (en couleur bleue sur la Figure 88), par exemple 29 624 individus ont été identifiés chez la lingue bleue (*Molva dypterygia*, 97 individus), 9 787 individus pour le merlu (*Merluccius merluccius*, 152 individus). Les autres espèces d'Anisakidae présentaient un nombre de parasites plus faible par espèce de poisson, de l'ordre de la centaine d'individus (Figure 94).

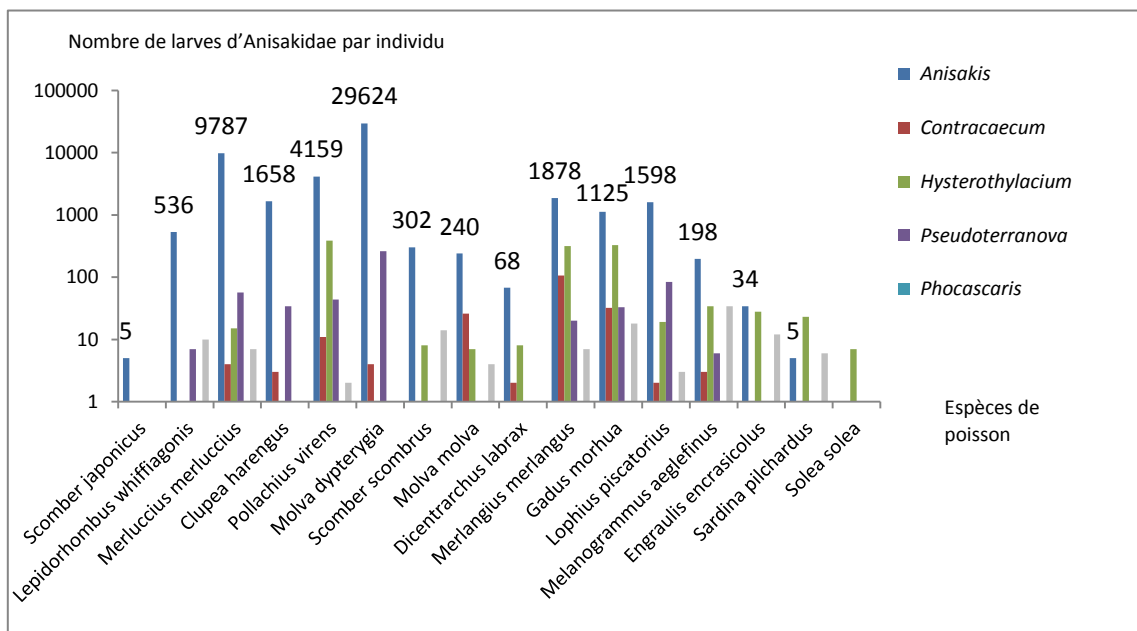


Figure 94 : Intensité des genres d'Anisakidae par espèce de poisson y compris les espèces non identifiées (échelle logarithmique).

III.5.2. Intensité moyenne des différents genres d'Anisakidae dans les localisations corporelles des poissons

La Figure 95 représente la diversité des Anisakidae au sein des différentes localisations corporelles du poisson. Seuls la cavité corporelle ($63,75 \pm 10,2$), les filets ($27 \pm 3,5$) et le foie ($25,8 \pm 3,49$) contenaient *Anisakis* en majorité. Pour les autres genres y compris les autres nématodes non identifiés dans les autres localisations corporelles, l'intensité reste homogène entre 1 à 3,91 individus par localisation corporelle. Comme cela a déjà été montré pour la prévalence dans la Figure 70, *Phocascaris* n'a été trouvé que dans les filets. *Anisakis* était présent dans toutes les localisations corporelles du poisson sauf dans la bouche. *Hysterothylacium* était présent dans toutes les localisations corporelles, contrairement à *Pseudoterranova* qui n'était présent qu'en faibles quantités dans la cavité corporelle, les filets et le foie. *Contraecaecum* présentait une localisation similaire à celle d'*Anisakis* puis qu'il était présent dans toutes les localisations corporelles sauf la cavité buccale et les branchies.

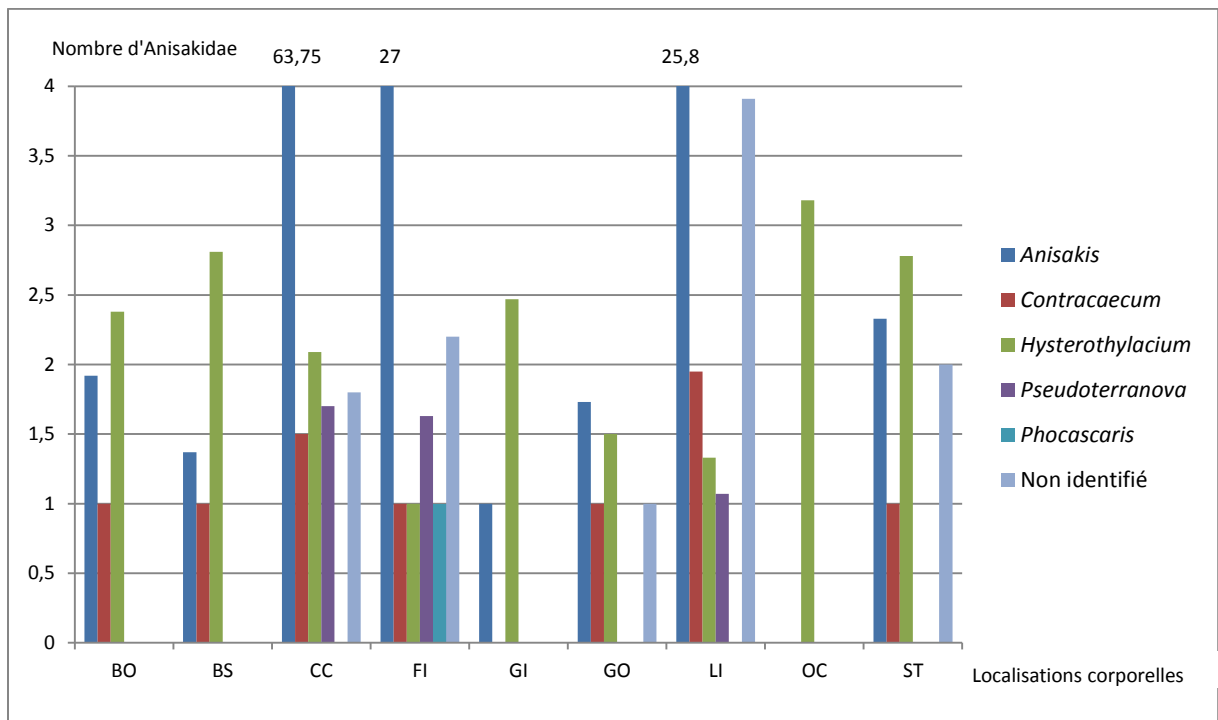


Figure 95 : Intensité moyenne des Anisakidae dans chaque localisation corporelle pour les 1 768 poissons. BO : intestin, BS : surface corporelle, CC : cavité corporelle, FI : filets, GI : branchies, GO : gonades, LI : foie, OC : bouche, ST : estomac

III.5.3. Intensité moyenne des différents genres d'Anisakidae dans les espèces de poisson

Seules trois localisations corporelles ont été sélectionnées pour être interprétées en raison de leurs fréquences de consommation comme les filets ou le foie et la cavité corporelle comme une localisation dans laquelle les parasites sont proches des filets. L'intensité moyenne sera comparée entre les différentes espèces de poisson par genre d'Anisakidae pour ces trois localisations.

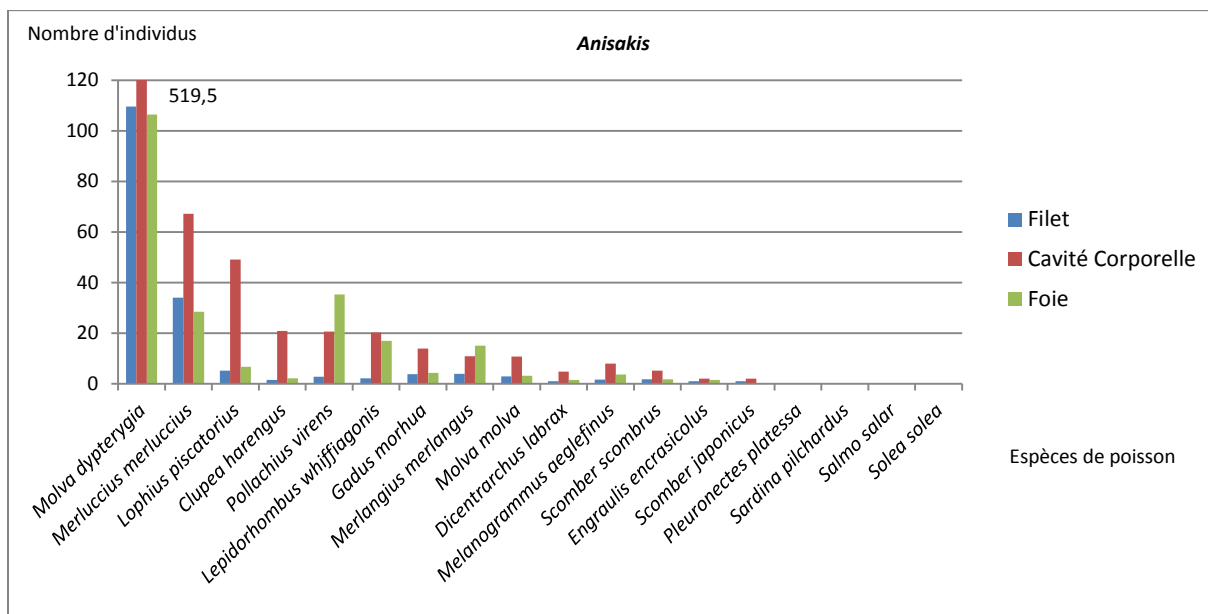


Figure 96 : Intensité moyenne d'*Anisakis* dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.

L'intensité moyenne des *Anisakis* était inférieure à 20 individus pour l'ensemble des poissons échantillonnés. *Anisakis* était présent dans les trois localisations corporelles chez la lingue bleue : filets ($109,64 \pm 13,05$ individus), cavité corporelle ($519,50 \pm 98,5$ individus), foie ($106,44 \pm 22,58$ individus), chez le merlu : filets ($34,14 \pm 9,79$ individus), cavité corporelle ($67,30 \pm 19,72$) et foie ($28,49 \pm 10,57$), dans la cavité corporelle chez la baudroie ($49,19 \pm 14,35$ individus), dans le foie chez le lieu noir ($35,33 \pm 6,32$ individus) et la cavité corporelle ($20,69 \pm 5,61$). La plie, la sardine commune, le saumon Atlantique (élevage) et la sole n'étaient pas parasités par *Anisakis*.

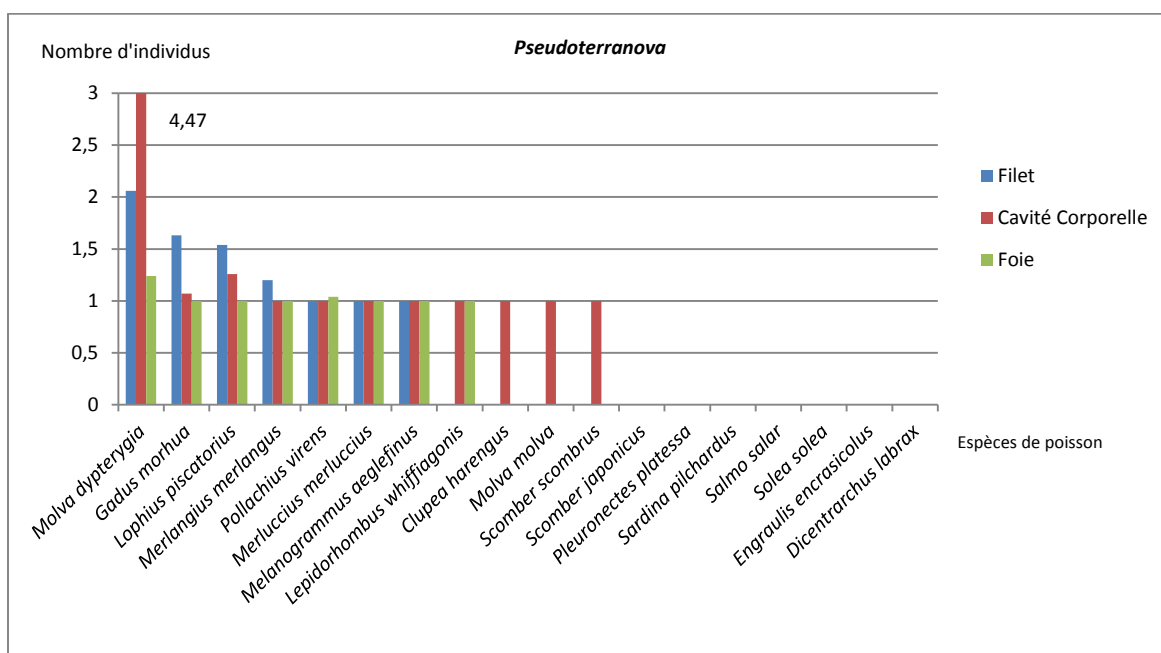


Figure 97 : Intensité moyenne de *Pseudoterranova* dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.

Sept espèces de poissons étaient infectées par *Pseudoterranova* dans les trois localisations corporelles : la lingue bleue, le cabillaud, la baudroie, le merlan, le lieu noir, le merlu et l'églefin. Le merlu et l'églefin étaient parasités avec une intensité identique pour les trois localisations d'un individu. L'intensité la plus élevée était de $4,47 \pm 2,3$ individus dans la cavité corporelle de la lingue bleue. La cardine franche n'était parasitée que dans la cavité corporelle et le foie. Le hareng, la lingue franche et le maquereau commun étaient parasités en moyenne par un individu de *Pseudoterranova* dans la cavité corporelle. Les autres espèces de poissons n'étaient pas parasitées par le genre *Pseudoterranova*.

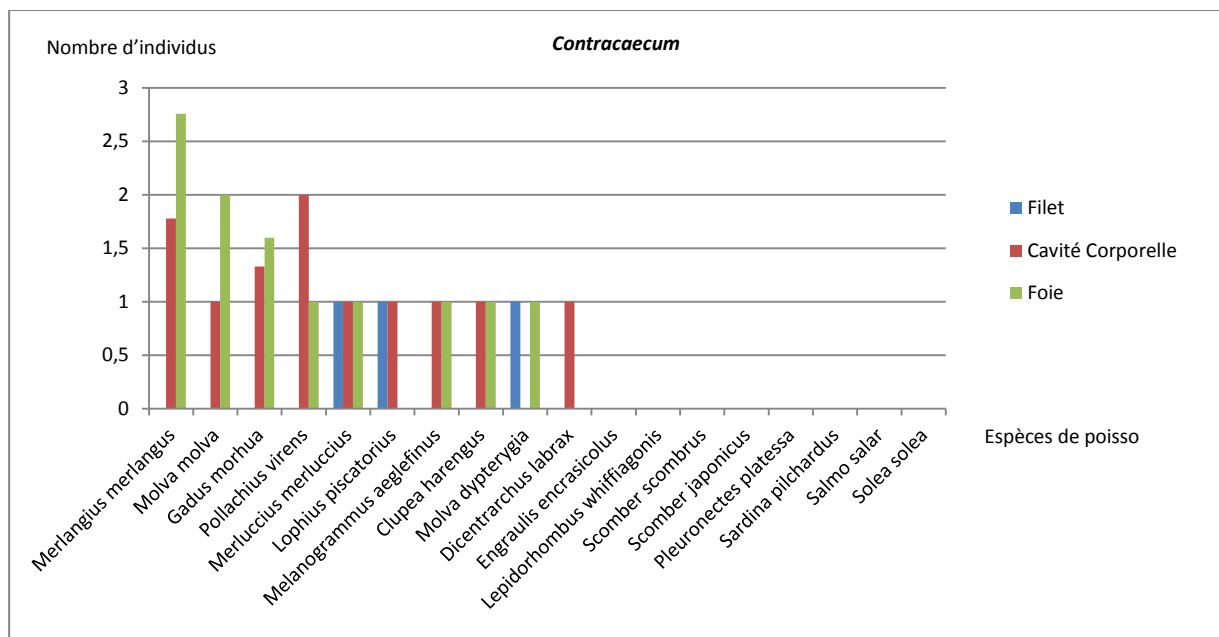


Figure 98 : Intensité moyenne de *Contracaecum* dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.

Seul le merlu était parasité dans les trois localisations corporelles par *Contracaecum*. Le merlan, la lingue franche, le cabillaud, le lieu noir, la baudroie, le hareng et la lingue bleue étaient parasités dans seulement deux localisations corporelles. Le bar n'était lui contaminé que dans la cavité corporelle. L'intensité maximum a été observée dans le foie ($2,76 \pm 0,38$ individus). Huit espèces de poisson étaient exemptes de *Contracaecum*.

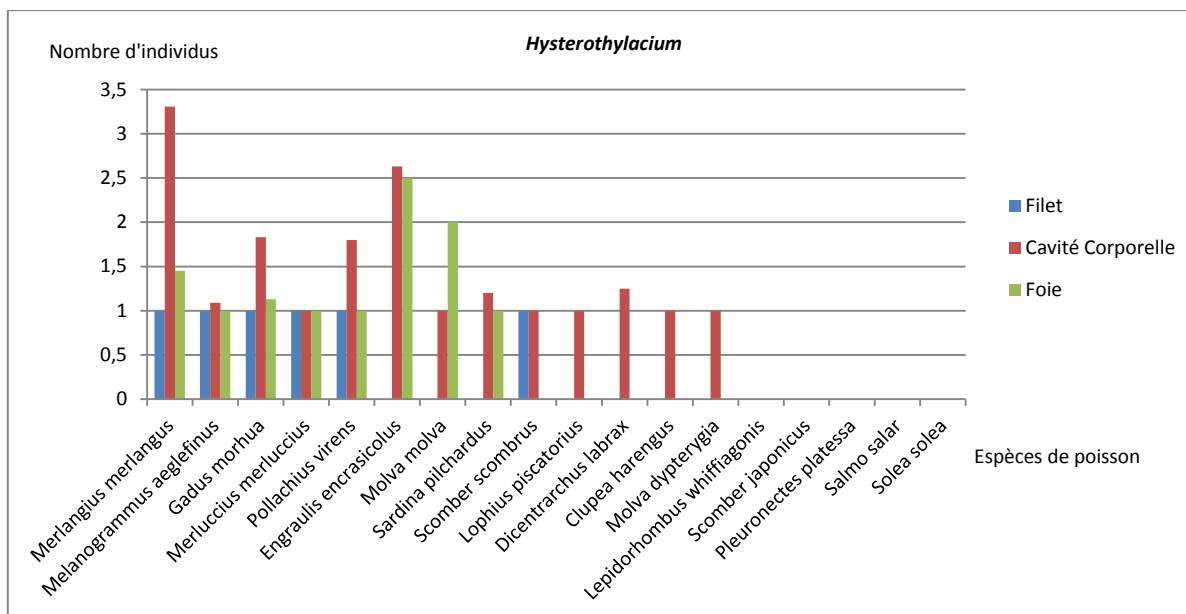


Figure 99 : Intensité moyenne de *Hysterothylacium* dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.

L'intensité moyenne la plus grande pour *Hysterothylacium* était de $3,31 \pm 0,65$ individus dans la cavité corporelle du merlan. Le merlan, l'églefin, le cabillaud, le merlu et le lieu noir étaient infectés dans les 3 localisations corporelles étudiées. L'anchois, la lingue franche, la sardine et le maquereau commun étaient parasités dans deux localisations corporelles. Pour la baudroie, le hareng et la lingue bleue, *Hysterothylacium* a été identifié uniquement dans la cavité corporelle.

Phocascaris a été identifié uniquement dans un filet de lingue bleue.

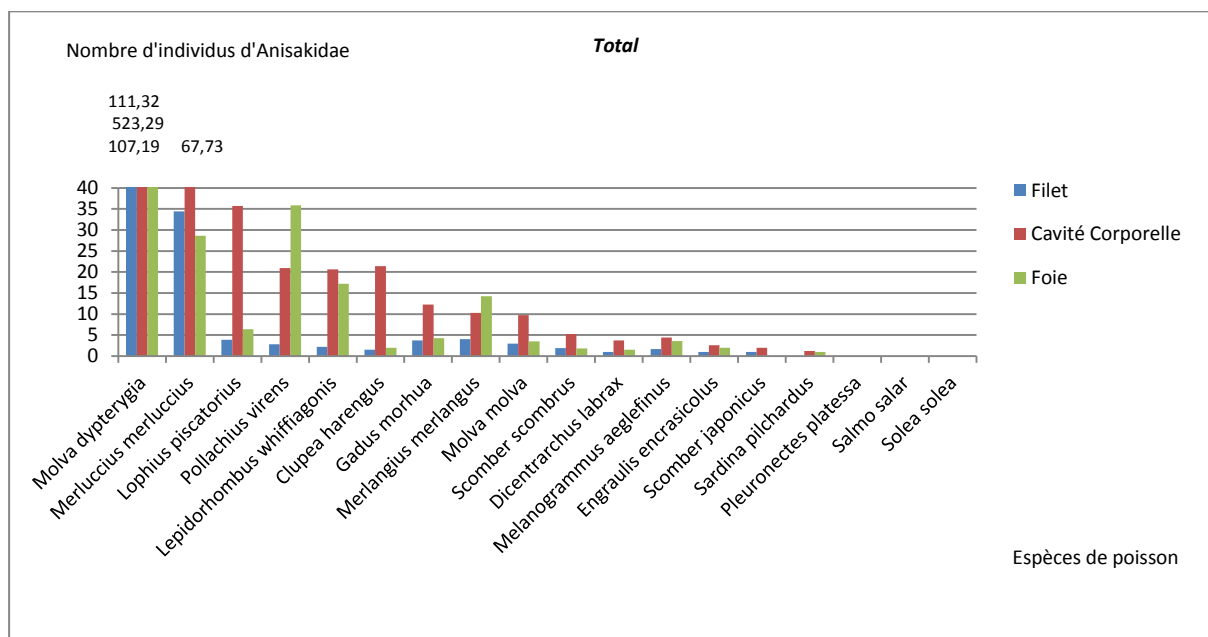


Figure 100 : Intensité moyenne des genres d'Anisakidae dans les filets, la cavité corporelle et le foie pour les 18 espèces de poisson.

Globalement, huit espèces de poissons contenaient plus de dix Anisakidae en moyenne : la baudroie (*Lophius piscatorius*, dans la cavité corporelle), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*, dans le foie et la cavité corporelle), le hareng (*Clupea harengus*, dans la cavité corporelle), le lieu noir (*Pollachius virens*, dans la cavité corporelle et dans le foie), la langue bleue (*Molva dypterygia*, dans les trois localisations corporelles), le merlan (*Merlangius merlangus*, dans le foie). Les intensités moyennes les plus élevées ont été rencontrées chez la langue bleue dans la cavité corporelle ($523,29 \pm 99,64$ Anisakidae), dans les filets ($111,31 \pm 13,03$ Anisakidae), dans le foie ($107,19 \pm 22,70$ Anisakidae) et chez le merlu (*Merluccius merluccius*) dans la cavité corporelle ($67,73 \pm 19,74$ Anisakidae). Parmi les trois localisations corporelles sélectionnées, la sardine commune (*Sardina pilchardus*) n'était infestée que dans la cavité corporelle et dans le foie.

Les intensités de *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, *Hysterothylacium* et *Phocascaris* étaient toutes inférieures à cinq individus par localisation corporelle pour l'ensemble des localisations étudiées chez toutes les espèces de poissons infectées.

Pour les Anisakidae totaux dans les filets, la partie la plus consommée, à l'exception de la langue bleue ($111,32 \pm 13,03$ larves par poisson) et du merlu ($34,42 \pm 9,80$ larves par poisson), les autres espèces infectées avaient une intensité moyenne à basse, de 1 à 4,05 larves par poisson. Une tendance comparable a été observée pour *Anisakis*, parasite pathogène chez l'Homme. L'intensité moyenne de *Pseudoterranova*, également agent pathogène chez l'Homme, restait modérée avec 2,06 larves par poisson, ceci est donc plutôt rassurant pour les consommateurs, le risque de retrouver *Pseudoterranova* dans les filets étant faible.

Pour 25 baudroies des eaux du Nord-Ouest Galicien (Nord Est Atlantique, 27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud), $19,00 \pm 11,49$ larves *A. simplex s.s* ont été rapportées dans les mésentères, le foie, les gonades, l'estomac et les filets confondus (Abollo *et al.*, 2001). Dans notre étude, les 53 baudroies dans lesquelles des *Anisakis* ont été retrouvés, provenaient pour la plupart du golfe de Gascogne et pour une autre partie de la mer d'Irlande et de ses environs. Il s'agit donc d'une zone proche de celle de l'étude d'Abollo *et al.* (2001). L'intensité était de $49,19 \pm 14,35$ larves dans la cavité corporelle, $5,16 \pm 6,89$ larves dans les filets et $6,71 \pm 2,81$ larves dans le foie. Les intensités d'*Anisakis* de notre étude étaient largement plus importantes que celle décrites par Abollo *et al.* (2001).

Les 25 langues bleues du Nord-Ouest de la Galice (océan Atlantique Nord Est, 27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud) étudiées par Abollo *et al.* (2001) présentaient seulement $4,50 \pm 4,95$ larves d'*A. simplex s.s* par poisson dans les mésentères, le foie et les gonades confondus (Abollo *et al.*, 2001). En comparant seulement les *Anisakis* identifiés dans notre étude, l'intensité était très élevée : $109,64 \pm 13,05$ individus dans les filets, $519,50 \pm 98,5$ individus dans la cavité corporelle, $106,44$

± 22,58 individus dans le foie. Ce niveau d'intensité n'a jamais été décrit jusqu'à présent dans la littérature.

Dans notre étude, les 31 maquereaux espagnols provenant du golfe de Lion contenaient en moyenne 2,58 larves d'Anisakidae dans la cavité corporelle et une larve dans les filets. Il ne s'agissait que de parasites du genre *Anisakis*. Une étude de Rello *et al.* (2008) réalisée sur 359 maquereaux espagnols de l'océan Atlantique (Sud de l'Espagne) et de la côte méditerranéenne (Sud et Est de l'Espagne) a montré uniquement une intensité moyenne de 2,14 larves d'*Hysterothylacium* par poisson soit 1,80 larves dans les viscères et 1,56 larves dans les filets (Rello *et al.*, 2008).

Une étude effectuée sur 215 merlus échantillonnés dans la mer Egée en mer Méditerranée orientale (37.3.1) (Chaligiannis *et al.*, 2012) a montré une intensité faible de 8,9 larves par poisson identifiées par les méthodes morphologique et biochimique. Les merlus de notre étude provenaient du golfe du Lion n'étaient pas du tout parasités. Ce qui confirme que la prévalence d'Anisakidae chez le merlu en mer Méditerranée est faible. Une étude sur 25 merlus réalisée par Abollo *et al.* (2001) dans les eaux du Nord-Ouest de la Galice (océan Atlantique Nord Est, 27.VIII.c : golfe de Gascogne – sud) a montré jusqu'à $14,25 \pm 10,75$ larves d'*A. simplex* s.s par poisson (dans les filets, le foie, le gonade, l'estomac et le mésentère).

Pour le maquereau commun de la mer Egée (Chaligiannis *et al.*, 2012), l'intensité était de 14 larves d'Anisakidae par poisson. Selon Pulleiro *et al.*, 2015, aucun des six maquereaux communs de la mer Méditerranée (37.1.1) étudiés n'a montré la présence de parasites appartenant aux Anisakidae, mais cet effectif était très faible. Dans notre étude, 33 maquereaux communs provenant de la mer Méditerranée ne présentaient pas de contamination. Pour les autres zones de notre étude (golfe de Gascogne : 27.VIII et mer d'Irlande et ses environs : 27.VII), l'intensité moyenne était d'environ 1,9 larves dans les filets, 5,28 larves dans la cavité corporelle et 1,8 larves dans le foie par poisson. Ceci est moins élevé que les résultats obtenus par Abollo *et al.*, (2001) qui a rapporté la présence de $6,15 \pm 5,72$ larves d'*A. simplex* et *A. pegreffii* dans le mésentère, les foies, les gonades, l'estomac et les filets confondus dans 55 maquereaux communs étudiés provenant des eaux du Nord-Ouest de la Galice (océan Atlantique Nord Est, 27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud), ces intensités de notre étude et celles de la littérature restent basses pour le maquereau commun.

Pour la sardine commune, l'intensité moyenne issue de notre étude était de 0,26 Anisakidae par poisson contre un Anisakidae par poisson en mer Egée (Chaligiannis *et al.*, 2012). Cependant, le nombre de poissons analysés dans l'étude sur la mer Egée était de 5 à 77 poissons au maximum selon la sous-zone, l'effectif était donc plus faible par rapport à notre étude. Dans une autre étude sur 85 sardines communes (Pulleiro *et al.*, 2015), l'intensité en Anisakidae rapportée était de 1,5

larves par poisson en mer Méditerranée de la côte espagnole (Pulleiro-Potel *et al.*, 2015). En incluant le résultat de notre étude, l'intensité est faible voire nulle en Anisakidae pour la sardine commune en mer Méditerranée. Par contre, il n'y a eu aucun Anisakidae décrit dans les 50 sardines capturées dans les eaux du Nord-Ouest de la Galice (Nord Est Atlantique, 27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud) (Abollo *et al.*, 2001). Pour les prélèvements issus de l'océan Atlantique, notre étude a montré une prévalence de $19,23 \pm 7,73$ pour le golfe de Gascogne – central. Ceci montre que la sardine Atlantique était plus parasitée que celle provenant de la mer Méditerranée.

L'intensité par poisson des Anisakidae dans les anchois analysés au cours de notre étude n'était pas élevée globalement: une larve dans les filets, 2 larves dans le foie et 2,8 larves dans la cavité corporelle. Sur 67 anchois étudiés en mer Méditerranée, l'intensité d'Anisakidae était d'un Anisakidae par poisson (un *Anisakis* sp.) (Pulleiro-Potel *et al.*, 2015) contre une intensité nulle dans l'anchois pour notre étude réalisée dans la même zone de pêche. Gutiérrez-Galindo *et al.* (2010) ont montré également une prévalence nulle dans 153 anchois pêchés en mer Méditerranée le long de la côte espagnole (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 2010).

Les 106 bars (*Dicentrarchus labrax*) étaient infectés à cinq Anisakidae dans les 3 localisations corporelles par poisson au maximum. L'intensité la plus élevée était dans la cavité corporelle (3,76 larves). Ces bars provenaient du golfe de Gascogne (27.VIII), golfe de Lion (37.1.2 issu de l'élevage) et de l'océan Atlantique Nord Est dont la sous zone est non indiquée et de la Manche (27.VII.d). Le bar d'élevage n'était pas parasité par les Anisakidae. Bernardi *et al.* ont rapporté que, sur les 40 bars provenant de l'océan Atlantique Nord Est, il y avait 96,39 larves d'*A. simplex* en moyenne pour les 38 bars infectés dans les viscères et 1,94 larves par poisson dans les filets de 17 bars infectés (Bernardi *et al.*, 2011). Le bar de notre étude avait un niveau d'intensité bas par rapport au bar de la même zone issu de l'étude de Bernardi *et al.*. Une étude de Morsy *et al.*, a indiqué que les plus grandes intensités ont été identifiées chez un bar qui mesurait plus de 56 cm de longueur sur 300 bars de mer Méditerranée du côté de l'Égypte (Morsy *et al.*, 2012). Malheureusement, l'intensité n'était pas indiquée dans cette étude.

Chez l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), l'intensité du parasitisme par les d'Anisakidae était de 4,4 larves maximum par poisson dans la cavité corporelle. L'intensité de notre échantillon provenant du Nord de la mer du Nord était de 2,41 larves par poisson. Klimpel et Rückert ont rapporté en 2005, que l'intensité moyenne d'*H. aduncum*, seul genre identifié dans l'estomac chez 308 églefins, était de 8,4 à 46,6 larves par poisson dans la mer du Nord-Nord et central (Klimpel et Rückert, 2005). Dans notre étude *Hysterothylacium*, *Pseudoterranova* et *Anisakis* étaient identifiés dans la cavité corporelle, les filets et le foie. *Contracaecum* a été trouvé dans le foie et la cavité corporelle. L'intensité des 4 genres reste basse (< 10 larves par poissons pour les 3 localisations).

L'intensité moyenne globale la plus élevée chez le merlan (*Merlangius merlangus*) dans notre étude était dans le foie ($27,27 \pm 1,82$ larves par poisson). Parmi les genres infectés, *Anisakis* infectait les 3 localisations à moins de 15 larves par poisson. *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium* infectaient les 3 localisations avec une intensité moyenne de moins de 3,5 larves par poissons. *Contracaecum* était présent dans la cavité corporelle et le foie avec une intensité moyenne de moins de 3 larves par poisson. Un travail sur 203 merlans de la mer du Nord, avec une prévalence de 100 %, a montré une intensité de 16,1 à 42,4 larves d'*Hysterothylacium* par poisson infectés selon les différentes division de la mer du Nord (Klimpel et Rückert, 2005). Dans notre étude, le merlan était parasité par plusieurs genres par rapport au travail de Klimpel et Rückert, 2005. Sur la même division, seulement 13 poissons ont été échantillonnés dans notre cas dont 7 étaient infectés par des Anisakidae. L'intensité parasitisme par des Anisakidae dans 7 poissons était de 5,28 larves par poisson toutes localisations confondues.

Les 121 harengs (*Clupea harengus*) de notre étude étaient parasités à 21,44 larves par poisson au maximum (cavité corporelle). *Anisakis* contaminait dans les 3 localisations corporelles principales. *Hysterothylacium* n'était que dans la cavité corporelle à moins de 2 individus par poisson. *Contracaecum* infestait la cavité corporelle et le foie à 1 individu par poisson. *Pseudoterranova* n'infestait que la cavité corporelle avec un individu par poisson. Une étude effectuée sur 38 harengs provenant du Nord de la mer du Nord (27.IV.a) s'est intéressée à la migration des Anisakidae des viscères vers le muscle et a montré que dans les 37 heures suivant la pêche, le nombre de larves d'*Anisakis présentes* dans le muscle élevait à 1 763 larves (Smith et Wootten, 1975), ce qui est montre un niveau d'intensité élevé.

Sur les 81 lieux noirs (*Pollachius virens*) analysés provenant de la mer du Nord-Nord (27.IV.a), de la mer Celtique du Sud (27.VII.h) et de la sous-zone non déterminée de l'océan Atlantique Nord-Est, l'intensité moyenne la plus élevée était de 35,91 larves par poisson dans le foie. Dans les filets, l'intensité était faible (moins de 3 Anisakidae par poisson). Parmi les 3 localisations infestées par *Anisakis*, le foie était infecté par 20,69 larves en moyenne mais les filets étaient infectés par moins de 3 larves par poisson. *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium* infestait les 3 localisations corporelles avec moins de 2 individus par poisson. *Contracaecum* y était également présent mais dans la cavité corporelle et le foie avec 2 larves maximum par poisson. Dans une étude, 33 lieux noirs provenant du Nord de la mer du Nord étaient parasités de 1,1 à 2,6 larves d'*A. simplex* en moyenne (Klimpel *et al.*, 2004). Strømnes et Andersen ont rapporté la présence de 23,6 larves d'*A. simplex* dans 187 lieux noirs des eaux Norvégiennes (Strømnes et Andersen, 1998). C'est une intensité faible par rapport à notre étude mais cette valeur est seulement celle d'*A. simplex* et non Anisakidae.

Le cabillaud (*Gadus morhua*) dans notre étude provenait de mer Celtique du sud et Nord (27.VII.h et g), du Sud-ouest de l'Irlande-est (27.VII.j), de la Manche Est (27.VII.d), du Nord, centre et Sud de la mer du Nord (27.IV.a, b et c). Parmi les 3 localisations corporelles infectées, la cavité corporelle représentait la plus haute intensité moyenne d'Anisakidae (12,27 larves par poisson). Dans les filets, l'intensité moyenne était de 3,74 larves. *Anisakis* infestait les 3 localisations à moins de 13,97 larves par poisson. *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium* infestaient les 3 localisations corporelles avec moins de 2 larves par poisson. *Contracaecum* n'était présent que dans la cavité corporelle et le foie à moins de 2 larves par poisson. Les 300 cabillauds pêchés dans les eaux islandaises (27.Va) contenaient 3,6 larves par poisson (Hauksson, 2011). Le nombre d'*Anisakis* dans les 12 207 cabillauds achetés dans les 21 différentes régions de la Terre-Neuve et Labrador de Canada variait de 9,85 jusqu'à 66,52 larves par poisson (Bratley et Bishop, 1992). Une étude faite sur les cabillauds achetés chez un commerçant provenant de dix points d'échantillonnage sur lac Saint Laurent au Canada a révélé une intensité maximale de 3 à 28 larves par poisson pour *P. decipiens*, de 9 à 256 larves pour *A. simplex* et 6 à 123 larves pour *Contracaecum* (Boily et Marcogliese, 1995). Strømnes et Andersen ont montré une intensité moyenne d'*A. simplex* chez 183 cabillauds provenant des eaux Norvégiennes de 14,6 larves (Strømnes et Andersen, 1998). Toutes ces études montrent que les *Pseudoterranova* ont été très étudiés dans cette espèce de poisson, ceci peut être en lien avec la pathogénéité de ce genre.

Les saumons Atlantique (*Salmo salar*) provenant de l'élevage du Spitzberg et de l'île aux Ours (27.II.b) étaient exempts de parasites. Les saumons d'élevage ont une prévalence quasiment nulle. Seuls quelques cas ont été observés pour lesquels les individus n'avaient pas atteint la taille commerciale et étaient parasités. Ainsi dans le cas d'une ferme en Atlantique (1 Anisakidae dans un *caecum* intestinal) (Marty, 2008). Ceci s'explique par le fait que les poissons de cette ferme aient été mis dans l'environnement marin pendant 14 mois avant l'élevage fermé. Une autre ferme en Atlantique a également rapporté 4 larves d'*Hysterothylacium* pour 3 poissons et 4,11 larves d'*Anisakis* dans les viscères, 2,44 larves dans les filets en moyenne pour les 9 poissons infectés. Mais ces poissons ne sont pas destinés à la consommation humaine puisque leur poids n'a pas atteint le seuil requis (Mo *et al.*, 2014).

La lingue franche (*Molva molva*) a une intensité moyenne de moins de 10 larves d'Anisakidae par poisson pour chacune des 3 localisations corporelles dans notre étude. Piccolo (1999) a rapporté $0,3 \pm 1,3$ larves d'*A. simplex* / kg de filets et $0,1 \pm 0,1$ larve / kg de filets dans 79 lingues franches provenant de l'océan Atlantique Nord-Est (Piccolo *et al.*, 1999). Dans notre étude de 48 lingues franches, l'intensité dans les filets était de 3 larves d'*Anisakis* par poisson. L'intensité moyenne de la lingue franche dans les filets reste basse.

Dans notre étude, la plie et la sole n'étaient pas infestées. La cardine franche (*Lepidorhombus whiffitagonis*), la plie (*Pleuronectes platessa*), la sole (*Solea solea*) sont des espèces moins fréquemment mentionnées dans la littérature concernant l'intensité de parasitisme par les Anisakidae. Il y a 2,2 larves d'Anisakidae dans les filets, 17,18 dans le foie et 20,64 larves dans la cavité corporelle par poisson pour la cardine franche. L'intensité des Anisakidae dans les filets de cardine franche reste donc faible.

Sur cette partie prévalence et intensité des parasites, le Tableau XXXV montre les huit premières espèces de poisson selon quatre critères : intensité moyenne d'*Anisakis* dans les filets, la cavité corporelle et le foie, la prévalence globale des Anisakidae, leur prévalence dans les filets et la prévalence dans les viscères sachant qu'il y a des différences dans les effectifs de poisson. Ceci permet d'avoir une vue globale sur les espèces les plus parasitées selon ces critères. Les espèces de poisson qui présentaient des valeurs élevées pour ces quatre critères sont considérées comme les espèces les plus contaminées et du point de vue de la santé publique, elles peuvent présenter un risque sanitaire plus élevé (selon le résultat de notre étude effectuée sur la période 2012-2015). Pour chacun des quatre critères, sept espèces de poisson faisaient toujours partie des huit premières espèces, il s'agit de : la lingue bleue, le lieu noir, la cardine franche, la baudroie, le merlan, la lingue franche et le merlu. Le cabillaud fait partie du top-8 pour trois des critères alors que le maquereau commun n'apparaît dans les 8 premières espèces que pour un critère. La lingue bleue et la baudroie étaient très parasitées, cependant la prévalence et l'intensité pourraient être encore différentes si les larves d'Anisakidae avaient pu être recherchées dans les viscères pour les lots de baudroie et de lingue bleue manquants. Les espèces fortement parasitées dans les filets appartiennent à des familles différentes (*Scophthalmidae*, *Gadidae*, *Lophiidae*, *Merlucidae* et *Scombridae*) mais quatre espèces sur huit appartiennent à la famille des *Gadidae* (lingue bleue, lieu noir, lingue franche et merlan). Les autres *Gadidae* sont le cabillaud et l'églefin. La lingue était parasitée à 100 % dans les filets, l'intensité moyenne d'*Anisakis* est également très élevée (109,64 larves par poisson). La cardine franche était parasitée à 100 % également dans les filets mais l'intensité moyenne en *Anisakis* est la plus faible parmi les huit espèces (2,2 larves par poisson).

Tableau XXXV : Classement des huit espèces de poisson selon l'abondance moyenne des Anisakidae par poisson, la prévalence globale des parasites, leur prévalence dans les filets et dans les viscères.

Intensité moyenne d' <i>Anisakis</i> dans les filets	Nombre moyen de larves	Prévalence globale des Anisakidae dans les espèces de poisson	%	Prévalence des Anisakidae dans les filets de poisson	%	Prévalence des Anisakidés dans les viscères de poisson	%
<i>Molva dypterygia</i>	109,64	<i>Molva dypterygia</i>	100	<i>Molva dypterygia</i>	100	<i>Pollachius virens</i>	100
<i>Merluccius merluccius</i>	34,14	<i>Pollachius virens</i>	100	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	70	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	95
<i>Lophius piscatorius</i>	5,16	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	95	<i>Pollachius virens</i>	63	<i>Gadus morhua</i>	86
<i>Merlangius merlangus</i>	4	<i>Gadus morhua</i>	89	<i>Lophius piscatorius</i>	61	<i>Molva molva</i>	76
<i>Gadus morhua</i>	3,8	<i>Molva molva</i>	88	<i>Merluccius merluccius</i>	60	<i>Clupea harengus</i>	69
<i>Molva molva</i>	3	<i>Lophius piscatorius</i>	78	<i>Molva molva</i>	43	<i>Merluccius merluccius</i>	68
<i>Pollachius virens</i>	2,8	<i>Merlangius merlangus</i>	75	<i>Merlangius merlangus</i>	40	<i>Merlangius merlangus</i>	67
<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	2,2	<i>Merluccius merluccius</i>	72	<i>Scomber scombrus</i>	19	<i>Molva dypterygia</i>	62

Effectif total pour chaque espèce *Pollachius virens* : 81 ; *Merluccius merluccius* : 152 ; *Lepidorhombus whiffiagonis* : 20 ; *Gadus morhua* : 140 ; *Clupea harengus* : 121 ; *Merlangius merlangus* : 170 ; *Molva molva* : 48 ; *Molva dypterygia* : 94 ; *Lophius piscatorius* : 113 ; *Scomber scombrus* : 121.

Parmi les espèces présentes dans les quatre critères, lieu noir, merlan, merlu, baudroie, lingue bleue et lingue franche apparaissent dans les vingt-trois espèces les plus consommées en France (partie IV.1) (FranceAgriMer, 2015). Parmi ces huit espèces, la plupart sont couramment éviscérées à bord pour limiter l'éventuelle migration des parasites mais également pour des raisons d'hygiène et d'altération (Communauté européenne, 2005a).

Smith (1983) a montré que les Anisakidae migraient vers le muscle et surtout vers les flancs. Ces migrations des larves serait induites par la présence de matières grasses en plus grande quantité dans cette partie (Smith, 1983). Dans le cas de notre étude, la cardine franche est un poisson maigre et la prévalence des parasites dans le muscle et dans les viscères étaient toutes deux élevées. Dans le Tableau XXXV, la plupart des sept espèces les plus contaminées sont des poissons maigres (lingue bleue, lingue franche, cabillaud, merlan, merlu et baudroie). Peu d'études ont abordé l'influence du contenu en matières grasses de la chair de poisson sur la migration des nématodes Anisakidae. Des études expérimentales avec des suivis de nombres de parasites dans les filets et dans les viscères sous différentes conditions de conservation (temps et température) seraient en effet nécessaires pour évaluer clairement d'éventuelles différences entre espèces (Smith et Wootten, 1975).

Poissons

- Au total 1 768 poissons appartenant à 18 espèces (10 familles) prélevées dans l'océan Atlantique Nord- Est et dans la mer Méditerranée ont été analysés.
- Seules 2 espèces sur 18 n'étaient pas contaminées par des Anisakidae (Saumon d'élevage et plie)
- Sur les 16 espèces contaminées :
 - 85,33 % des localisations corporelles (13 578 localisations corporelles) étaient exemptes d'Anisakidae
 - 10,99 % des localisations corporelles (1 749 localisations corporelle) étaient parasitées par des Anisakidae
 - 2,17 % des localisations corporelles (384 localisations corporelles) étaient parasitées par des nématodes non identifiés à ce jour
- 22,96 % des poissons étaient contaminées conjointement dans les viscères et les filets (avec flancs)
- Les espèces **non parasitées** dans les **filets** étaient : la plie, la sardine, la sole, le saumon et le bar d'élevage

Distribution géographique des Anisakidae chez les hôtes paraténiques

- La lingue bleue des eaux féringiennes contient jusqu'à 7 espèces d'Anisakidae
- Plusieurs faits nouveaux ont été rapportés dans ce travail:
 - Modification de la limite Nord d'*A. pegreffii* : déplacée à la mer du Nord et aux eaux féringiennes
 - *A. paggiae* a été identifiée pour la première fois dans la lingue bleue et le cabillaud des eaux féringiennes
 - La cardine franche a été étudiée pour la première fois
- La similitude d'infestation des Anisakidae dans les sous-zones de pêche proche peut être due à la migration des poissons
 - Les Anisakidae sont un **marqueur biologique**
- Echantillonnage prépondérant en Manche Est, Mer Celtique et Golfe de Gascogne Nord

Prévalence

- Les espèces ayant les prévalences globales la plus élevée sont : lingue bleue, lieu noir, cardine franche, baudroie et merlan
- Les 5 espèces ayant les prévalences et intensités les plus élevées **dans les filets (avec flancs)** sont : lingue bleue, merlu, baudroie, cardine franche et lieu noir
- Les poissons issus d'élevage en pleine mer échantillonnés ne sont pas du tout parasités

IV. Etudes de facteurs influençant la prévalence des Anisakidae dans les poissons

IV.1. Résultats du modèle logistique multivarié appliqué aux données de prévalence et prédiction de la prévalence d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova*

Le modèle logistique permet d'étudier les différents facteurs pouvant influencer la prévalence de la contamination par *Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets. Comme indiqué dans la partie matériels et méthodes, cette étude a été faite en deux étapes. D'abord une étude du modèle logistique univarié a été effectuée. Au total, l'influence de neuf variables explicatives sur la prévalence a été étudiée, variable par variable : l'espèce des poissons, la famille des poissons, la taille des poissons, le poids des poissons, le sexe des poissons, le type maigre ou gras des poissons, la zone de pêche, la sous zone de pêche, et la saison de pêche. Cette étape préliminaire a permis de sélectionner les variables significatives et non colinéaires entre elles en utilisant plusieurs critères tels que la significativité de la variable et celle de l'AIC (Akaike Information Criteria) qui a permis de comparer la qualité de chaque modèle univarié. Plus l'AIC était petit, plus la qualité du modèle était bonne (Tableau XXXVI). Les résultats de l'étude univariée se trouvent dans l'Annexe 13.

Tableau XXXVI : Sélection des variables pour le modèle logistique multivarié

Variable	Intégration au modèle final	Justification
Espèce de poisson	Oui	Significative au seuil de 5 % et AIC faible.
Famille de poisson	Non	Très corrélée avec l'espèce de poisson. L'espèce de poisson a été sélectionnée car son AIC était plus faible.
Taille de poisson	Oui	Significative au seuil de 5 %.
Zone de pêche	Non	Significative au seuil de 5 % mais non gardée au final car très colinéaire avec l'espèce du poisson.
Sous zone de pêche	Non	Significative au seuil de 5 % et AIC plus faible que la zone de pêche mais fortement colinéaire avec l'espèce du poisson.
Type maigre/gras	Non	Significative au seuil de 5 % mais non gardée car très corrélée à l'espèce du poisson ainsi qu'à la taille.
Poids	Non	Très corrélée avec la taille. La taille a été préférée car elle avait un AIC plus faible
Saison de pêche	Non	Significative au seuil de 5 % mais non gardée car très corrélée à l'espèce du poisson ainsi qu'à la taille.
Sexe	Non	Non significative au seuil de 5 %

L'AIC : Akaike information criterion: Critère de qualité du modèle (comparaison à d'autres modèles), plus l'AIC est faible, meilleur est le modèle.

Selon l'analyse univariée, seule la variable sexe était non significative. Selon le résultat des tests et la comparaison des AIC des différents modèles, plusieurs variables étaient significatives mais elles étaient souvent colinéaires l'une avec l'autre comme la saison ou la zone de pêche colinéaires avec l'espèce de poisson, la famille de poisson également avec l'espèce de poisson. Si une variable colinéaire avec une autre était gardée, les effets significatifs de chacune n'auraient pas pu être

différenciés. Seules les variables espèce et taille des poissons ont été sélectionnées afin d'analyser leur influence sur la prévalence des *Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets des 18 espèces de poissons provenant de l'océan Atlantique Nord-Est et de la mer Méditerranée. La variable espèce de poisson était la meilleure variable significative dans notre modèle univariée. La variable taille était significative et non colinéaire avec l'espèce de poisson. Elle constituait la deuxième variable pour l'analyse multivariée.

La colinéarité de plusieurs variables significatives pourrait être due au plan d'échantillonnage. Cela veut dire qu'entre le plan d'échantillonnage, théorique, bien équilibré (effectifs, espèces de l'échantillon, zone de pêche et répétabilité d'échantillonnage) et les données collectées en pratique, il peut exister une différence, les captures en mer n'étant par définition pas totalement maîtrisables. Par ailleurs, le plan d'échantillonnage du programme *Fish-Parasites* a dû être modifié suite au manque du temps et de budget, ce qui a conduit à privilégier certaines espèces ainsi qu'à diminuer le nombre d'échantillons sans modifier l'étendue des zones de pêche étudiées. De plus, il n'a pas toujours été simple d'obtenir les échantillons de la zone de pêche ou de la taille souhaitée pour certaines espèces de poisson. Il faut également noter que certains facteurs tels que les migrations du poisson d'une zone à une autre, les migrations des hôtes définitifs, l'influence des courants marins, le réseau trophique, la biologie du poisson peuvent influencer la répartition des Anisakidae tout en étant difficilement contrôlables.

L'analyse logistique multivariée a été effectuée par la méthode ascendante, c'est-à-dire en ajoutant une variable à une autre variable pour étudier l'effet de chaque combinaison des variables. Le modèle logistique multivarié est présenté dans l'Annexe 13. Le Tableau XXXVII montre le résultat de l'étude logistique multivariée. Les résultats sont classés dans l'ordre décroissant de la valeur d'Odds ratio (OR). Dans cette étude, l'ordonnée à l'origine équivalente à l'Odds ratio de l'ensemble des données a été déterminée à 0,03 et l'intervalle de confiance supérieur à 0,14 (IC 95 %). Le résultat de P Wald pour l'ensemble des données est significatif ($< 0,05$). L'anchois a été choisi comme classe de référence pour sa faible prévalence et son grand effectif. Les 18 espèces de poissons représentaient les modalités de la variable espèce. La deuxième variable explicative de la prévalence choisie pour le modèle était la taille du poisson. La valeur d'AIC était de 977,2, celle-ci était bien plus petite que celles des modèles univariés (1123,4 à 1862,9). Cela montre que l'étude multivariée est utile, efficace et significative.

Tableau XXXVII : Résultats du modèle logistique multivarié

réalisé sur l'ensemble des données et prédictions de prévalence d'*Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets des 18 espèces analysées (OR : odds ratio, IC95 : intervalle de confiance à 95 %, P Wald : P value du Wald test, P vrais : test du rapport de vraisemblance, AIC : Akaike information criterion).

Variables	Résultat des tests du modèle logistique multivarié (AIC de 977,2)					Poids moyen (g± Ecart type)	Taille moyenne (cm± Ecart type)	Prédiction de la prévalence en % à la moyenne de la taille du poisson		
	OR	IC95		P vrais	P Wald			Borne inf IC = 95 %	Moyenne	Borne sup IC = 95 %
		inférieur	Supérieur							
Ordonnée à l'origine	0,03	0	0,14	-	0,0006	-	-	-	-	
<i>Engraulis encrasicolus</i> (anchois)	-	-	-	-	-	15,33±9,5	13,08±2,12	0,1	0,68	4,68
<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (cardine franche)	117,7	16,47	2504,93		0,0001	375,94±177,01	36,38±6,43	50,00	76,00	91,00
<i>Merluccius merluccius</i> (merlu)	55,74	11,04	1017,99		0,0001	430,92±446,04	38,15±9,89	52,00	61,00	69,00
<i>Merlangius merlangus</i> (merlan)	37,81	7,67	685,31		0,0004	278,54±84,39	32,51±3,47	36,00	44,00	53,00
<i>Lophius piscatorius</i> (baudroie)	26,53	4,67	503,11		0,0024	2194,9±1972,63	53,27±15,92	53,00	65,00	75,00
<i>Molva dypterygia</i> (lingue bleue)	23,73	2,07	641,44		0,0215	3675,32±1331,85	96,89±12,15	86,00	95,00	99,00
<i>Clupea harengus</i> (hareng)	14,43	2,58	270,77		0,0128	174,41±107,6	25,76±5,18	9,08	17,00	29,00
<i>Pollachius virens</i> lieu noir)	14,26	2,23	282,59		0,0181	1298,94±830,19	51,64±9,89	33,00	48,00	63,00
<i>Scomber scombrus</i> (maquereau commun)	11,96	2,34	219,02		0,0176	207,79±115,55	28,88±6,09	11,00	17,00	25,00
<i>Molva molva</i> (lingue franche)	5,13	0,67	109,29		0,1697	3432,92±3113,11	79,58±20,56	43,00	62,00	77,00
<i>Melanogrammus aeglefinus</i> (églefín)	4,43	0,78	83,81		0,1677	486,16±385,55	32,81±12,36	4,83	8,62	15,00
<i>Gadus morhua</i> (cabillaud)	3,61	0,58	70,16		0,2464	1159,97±1028,45	44,54±10,5	7,54	13,00	22,00
<i>Scomber japonicus</i> (maquereau espagnol)	2,81	0,11	72,73		0,4701	129,19±12,92	22,48±2,19	0,45	3,19	19,00
<i>Dicentrarchus labrax</i> (bar)	1,66	0,15	37,28		0,6887	535,52±288,34	36,17±4,49	1,03	4,13	15,00
<i>Sardina pilchardus</i> (sardine commune)	9,56E-07	NA	2,57E+41		0,9809	49,52±36,11	17,56±4,45	NA	0	0
<i>Solea solea</i> (sole)	4,93E-07	NA	2,89E+60		0,9844	240,53±114,02	28,6±3,84	NA	0	0
<i>Pleuronectes platessa</i> (plie)	3,31E-07	NA	4,36E+99		0,9896	534,91±302,39	35,66±6,03	NA	0	0
<i>Salmo salar</i> (saumon Atlantique)	7,15E-08	NA	1,78E+88		0,9872	2330,43±517,65	62,6±3,49	NA	0	0
Taille de poisson	3,46	2,33	5,27		2,51E-09	-	-	-	-	-

OR (Odds ratio) : exprimant le degré de dépendance entre des variables aléatoires qualitatives, **P Wald** : exprimant le degré de dépendance entre des variables aléatoires quantitatives, **P-vrais** (Probabilité vraisemblance) : est un rapport de vraisemblance AIC : Critère de qualité du modèle (plus il est petit meilleur est le modèle)

La cardine franche est une espèce dont la valeur d'Odds ratio est la plus élevée (117,7). Sa prévalence pourra être très éloignée de celle de l'espèce de référence (anchois).

Les autres espèces comme le merlu, le merlan, la baudroie, le lieu noir, le hareng, la lingue bleue et le maquereau commun ont des Odds ratio intermédiaires (entre 11,96 et 55,74). La lingue franche, l'églefin, le cabillaud, le maquereau espagnol et le bar ont des valeurs d'Odds ratio entre 1,66 à 5,13. Les quatre espèces (sardine commune, sole, plie et saumon Atlantique) ont des valeurs d'Odds ratio inférieures à un. Ce dernier groupe de poisson correspond à des poissons non contaminés par *Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets.

L'intervalle de confiance de 95 % montre qu'il y a 95 % de chance que la cardine ait des valeurs d'Odds ratio entre 16,47 et 2 504,93 et pour le merlu des valeurs entre 11,04 et 1 017,99. C'est une très grande variabilité du niveau de contamination. Pour la lingue franche, le maquereau commun, le lieu noir, le hareng, la baudroie, la lingue bleue et le merlan, l'intervalle de confiance de l'Odds ratio supérieur est de l'ordre 109,29 jusqu'à 685,31 ce qui reste toujours très variable. L'intervalle de confiance supérieur de l'Odds ratio du bar, du maquereau espagnol, du cabillaud et de l'églefin sont de 37,28 à 83,81. Pour les 4 espèces, les valeurs de l'intervalle de confiance sont non estimables. La qualité de ces résultats est confirmée par le *P* vrais (test de vraisemblance), prenant en compte toutes les modalités des variables afin de les comparer à la référence qu'est l'anchois et par le *P* Wald prenant en compte toutes les modalités de la variable espèce de poisson afin de les comparer avec la référence qu'est l'anchois. La *P* vrais est bien inférieure à 0,05 ($2 \cdot 10^{-16}$), ce qui montre que le résultat est significatif et que la prévalence d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova* dans les filets est bien influencée par l'espèce de poisson. Pour le *P* Wald, les résultats sont plus contrastés avec certaines espèces (la cardine, le merlu, le merlan, la baudroie, la lingue bleue, le hareng, le lieu noir et le maquereau commun) pour lesquelles cette valeur est significative, indiquant que les prévalences d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova* dans les filets sont bien significativement différentes de celle trouvée chez l'anchois. En revanche pour la lingue franche, l'églefin, le cabillaud, le maquereau espagnol et le bar, cette valeur est supérieure à 0.05 indiquant donc que les prévalences d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova* dans les filets de ces espèces ne sont pas significativement différentes de celle de l'anchois. Cependant, il est important de noter que cette valeur de *P* Wald est calculée pour l'influence de l'espèce de poisson sur la prévalence, une fois déduite l'influence de la taille des poissons. Ainsi, les valeurs non significatives de *P* Wald obtenues pour la lingue franche et le cabillaud sont probablement dues à une plus forte influence de la taille de ces poissons par rapport à leur appartenance à une espèce. En revanche, les valeurs de *P* Wald non significatives pour des

espèces telles que la sardine, la sole, la plie et le saumon Atlantique sont peu exploitables étant donné que ces espèces n'étaient pas infectées.

La variable taille montre que plus la taille est grande (supérieure à la taille poisson de référence : l'anchois), plus le poisson sera susceptible d'être parasité (P wald et P vrais sont significatifs).

Les trois dernières colonnes du Tableau XXXVII représentent la prédiction de la prévalence des *Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets des 18 espèces de poissons pour des poissons dont la taille est proche de celle de la moyenne des poissons échantillonnés pour chaque espèce. La valeur de la prédiction de la prévalence permet de séparer les espèces de poisson en plusieurs classes : celles dont la prédiction est supérieure à 60 % (le merlu : 62 %, la lingue franche : 62 %, la baudroie : 65 %, la cardine franche : 75 % et la lingue bleue : 95 %), celles dont la prédiction est entre 40 et 60 % (le merlan : 44 % et le lieu noir : 48 %), celles dont la prévalence est entre 10 et 40 % (le cabillaud : 13 %, le hareng : 17 % et le maquereau commun : 17 %), et celles dont la prévalence est inférieure à 1 % (l'anchois, l'églefin et le bar). Une dernière catégorie comporte des espèces pour lesquelles la prédiction est inconnue car ces espèces n'étaient pas infestées par les deux genres de parasites dans leurs filets (la sole, la plie, le saumon atlantique et la sardine). Trois espèces de poisson présentaient des valeurs des bornes inférieure et supérieure de prédiction de la prévalence élevées. Ceci montre la grande variabilité d'infestation qui a été observée au sein de ces espèces pour la présence d'*Anisakis* et *Pseudoterranova* dans leurs filets (la cardine franche, le lieu noir et la lingue franche).

IV.1. Prédiction de la prévalence par le modèle logistique multivarié

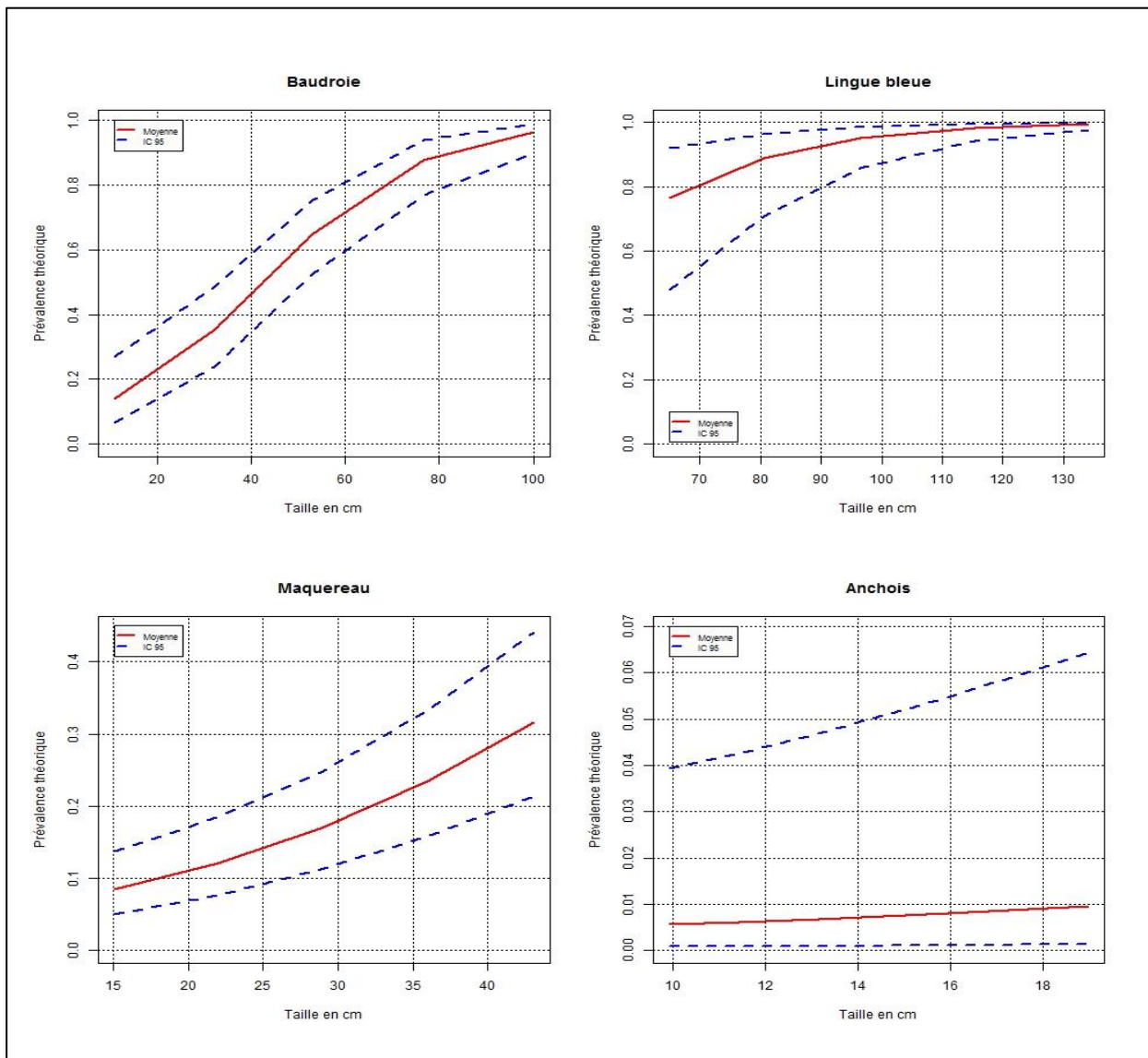


Figure 101 : graphiques représentant la prédiction de la prévalence d'*Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets de la baudroie, la lingue bleue, le maquereau commun et l'anchois en se basant sur la taille des poissons. Ligne rouge : prédiction de la prévalence, ligne pointillée bleue : intervalle de confiance à 95 %.

Suite à l'analyse logistique multivariée des données de prévalence, des prédictions de la prévalence d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova* dans les filets des différentes espèces échantillonnées ont pu être réalisées en fonction de la taille du poisson (Figure 101 et Annexe 13). Pour les 4 espèces de poissons présentées dans la Figure 101, la prévalence augmente en fonction de la taille.

Pour la baudroie, la prévalence augmente fortement avec la taille des poissons et l'intervalle de confiance est constant. Ceci montre qu'il y a une grande différence de prévalence entre les différentes classes de taille. La prévalence a une tendance à se stabiliser pour les poissons de grande

taille. L'augmentation de la prévalence ralentit, se stabilise et la prévalence peut atteindre 100 % pour les poissons d'une taille proche de 100 cm.

La prédiction pour la lingue bleue montre que la prévalence augmente légèrement avec la taille des poissons avec un intervalle de confiance qui est de plus en plus petit pour les poissons de grande taille. Cela signifie que la variabilité de la prévalence est plus faible pour les poissons de grande taille, et donc que la prédiction est plus fiable. Il n'y a pas beaucoup de différence de prévalence entre les poissons de 80 cm et 100 cm. La prévalence pourra atteindre 100 % pour des individus de 130 cm.

Pour le maquereau commun, cette prédiction de l'évolution de la prévalence augmente également avec la taille des poissons, mais l'intervalle de confiance qui augmente indique une fiabilité faible de cette prédiction, due soit à l'effectif faible de l'échantillon, soit à une grande variabilité des prévalences observées. La prévalence pourrait atteindre 30 % pour une taille de 40 cm.

Pour l'anchois, la prédiction a montré une faible prévalence (1 % pour les poissons de 18 cm). La borne supérieure de l'intervalle de confiance est trop haute par rapport à la prévalence moyenne tandis que l'intervalle de confiance inférieur est constant. La prédiction n'est pas très fiable pour l'anchois. Ceci peut être dû à la prévalence basse des Anisakidae dans cette espèce de poisson.

Quelques études statistiques basées sur des modèles statistiques logistiques (uni ou multi-variés) pour analyser l'influence de divers facteurs sur la prévalence des Anisakidae ont été publiées. Une étude intéressante d'Abattouy *et al.* a été réalisée en 2011, sur des maquereaux espagnols (*Scomber japonicus*) des eaux marocaines du côté de l'océan Atlantique Nord Est (131 individus, prévalence de 67,9 %) et de la mer Méditerranée (zone 37.1.1, 135 individus, prévalence de 57 %) (Abattouy *et al.*, 2011). Une analyse similaire à celle de notre étude a été réalisée. Les variables ayant une influence significative sur la prévalence étaient le poids total et la taille du poisson, le poids du foie, des gonades, la saison et la zone de capture. En revanche, la variable sexe n'était pas significative. Elle n'a donc pas été incluse dans l'analyse multivariée comme dans notre étude et dans l'étude de (Cremonte et Sardella, 1997). Cela montre que cette variable sexe n'influence donc pas sur la prévalence d'*Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets des poissons. Les variables taille et poids des poissons sont colinéaires selon notre étude et celle d'Abattouy *et al.* et Pulleiro-Potel *et al.* (Pulleiro-Potel *et al.*, 2015). Abattouy *et al.* ont choisi la variable poids dans l'analyse multivariée au lieu de la taille parce que le poids est plus évident à évaluer au moment de l'achat par les consommateurs. Cependant, la taille peut être facilement évaluée par le client lorsqu'il effectue un achat. Pulleiro *et al.* (2015) ont également montré qu'il y avait une corrélation entre les variables taille et poids, toutes deux influençant la prévalence en Anisakidae dans l'anchois et la sardine de la mer Méditerranée. Il

a été montré également que le risque de la présence d'Anisakidae augmente en fonction du poids du poisson également lorsque le poids est corrélé avec la taille. Cette corrélation des deux variables a déjà été rapportée par Cremonte et Sardella dans le maquereau espagnol des eaux de l'Argentine et par Gutiérrez-Galindo *et al.* en 2010 dans le maquereau commun en mer Méditerranée proche des côtes espagnoles par Gutiérrez-Galindo *et al.*, 2010. Selon Abattouy, pour éviter le risque parasitaire lié aux Anisakidae, il est donc conseillé de consommer plutôt les poissons de plus petite taille (Abattouy *et al.*, 2011). En revanche, pêcher des poissons de petite taille n'est pas une bonne mesure de gestion des pêcheries car ce sont des poissons qui n'ont souvent pas eu le temps de se reproduire.

Selon l'analyse multivariée dans l'étude d'Abattouy *et al.* en 2011, l'augmentation du risque parasitaire dû aux Anisakidae est de 2 % par gramme de poisson et de 28 % par gramme de gonades. L'étude que nous avons amenée est la première visant à produire des données de prévalence des parasites Anisakidae pour les espèces de poisson les plus consommées en France. Nos résultats pourront donc servir de base à de futures études qui se focaliseront sur les espèces comportant un risque parasitaire élevé afin de limiter leur impact en termes de santé publique et/ou de pertes économiques.

Dans notre étude, la variable espèce de poisson a été privilégiée par rapport à la variable zone de pêche qui lui était colinéaire. Pulleiro-Potel *et al.*, (2015) ont expliqué dans leur étude que la prévalence n'était pas influencée par la zone de pêche, ceci peut être expliqué par l'absence de différence de prévalence et d'intensité chez l'hôte définitif dans les différentes zones de pêche. En revanche, au niveau du plan d'échantillonnage de son étude, il s'avère qu'il n'y avait pas beaucoup d'effectif par zone de pêche. Il y avait environ 8 poissons de 10 espèces possibles par zone de pêche (290 poissons de 10 espèces pour 36 zones de pêches). Cela peut aussi justifier la non significativité de la zone de pêche dans son étude.

Pour la saisonnalité, Abattouy *et al.* (2011) ont trouvé une prévalence d'*Anisakis*/Anisakidae dans les maquereaux espagnols plus élevée en hiver et en automne qu'au printemps et en été. En revanche, Gutiérrez-Galindo *et al.*, en 2010, ont trouvé une prévalence supérieure en été par rapport à l'hiver sur des maquereaux communs. Dans notre étude, la saisonnalité était colinéaire de l'espèce et de la taille du poisson. Cette variable n'a donc pas été incluse dans l'analyse multivariée. La différence de prévalence trouvée par ces études était peut-être due aux variations saisonnières qualitatives et quantitatives du plancton qui joue un rôle d'hôte intermédiaire dans le cycle biologique de ces parasites (Cognetti *et al.*, 2001 dans Abattouy *et al.*, 2001).

Dans une étude sur 300 cabillauds des eaux islandaises (27.V.a) de Haukson (2011), il a été montré que la profondeur est un facteur influençant la prévalence d'Anisakidae chez le poisson car le

long de la côte dans les eaux peu profondes, se trouvent de plus grands nombres d'œufs d'Anisakidae excrétés par leurs hôtes définitifs (Hauksson, 2011). Ceci est concordant avec l'étude de Pulleiro-Potel qui disait que la profondeur influence la prévalence des Anisakidae et que pour éviter le risque d'anisakidose, il est donc conseillé de pêcher dans des eaux profondes (Pulleiro-Potel *et al.*, 2015) mais cette variable n'a pas été étudiée dans notre projet.

Finalement, selon les différentes études, un même facteur n'a pas toujours une influence significative sur la prévalence des Anisakidae. Toutefois, la variable sexe a été observés comme non significative par plusieurs études dont la nôtre. La colinéarité entre certaines variables telles que le poids et la taille a été observée par plusieurs auteurs (Abattouy *et al.*, 2011 ; Cremonte et Sardella, 1997 ; Gutiérrez-Galindo *et al.*, 2010). La zone de pêche n'est pas toujours significative, ce qui est probablement dû soit à des biais d'échantillonnage, soit à des répartitions des autres hôtes intervenant dans le cycle biologique de ces parasites équivalentes, voire à des réseaux trophiques communs entre ces zones. Malgré le plan d'échantillonnage bien établi en amont, la collecte des échantillons a été soumise aux aléas des captures, ce qui a compliqué le traitement statistique des données.

IV.2. Relations entre les prévalences parasitaires

IV.2.1. Analyse des correspondances multiples

Une analyse des correspondances multiples (ACM) a été effectuée sur l'ensemble des données. Elle a permis de montrer un profil de relations entre les prévalences des différents parasites et leur localisation dans les poissons, visant ainsi à caractériser les poissons échantillonnés selon des variables qualitatives. L'analyse a porté sur 1 511 enregistrements pour lesquels aucune donnée n'était manquante et sélectionnés à l'aide du package FactoMineR (1.31.3). La réalisation d'une ACM permet de résumer simplement l'ensemble de l'information d'un jeu de données sur un ou plusieurs graphiques en fonction de l'inertie ou de la variance portée par chaque axe défini par l'analyse.

Le Tableau XXXVIII montre les douze axes de classement des données obtenus après l'analyse. Ce tableau permet de distinguer les pourcentages de variance qui présentent un léger décrochage après le 3^{ème} axe. Seuls les axes 1 à 3 ont été conservés pour décrire la structure des données, les axes suivants n'étant que peu informatifs. Il convient de noter que le pourcentage cumulé de la variance expliquée par ces 3 axes n'est que de 44,42 % pour l'étude, ceci est probablement dû à l'importance de la taille du jeu de données et au grand nombre de variables et de modalités mais cela n'affecte en rien l'analyse des données qui a été réalisée dans cette approche qualitative.

Tableau XXXVIII : Pourcentage des variances pour les douze axes explicatifs de la prévalence des différents genres d'Anisakidae dans la cavité corporelle, le foie et les filets.

axes	% variance	% cumulé de la variance
axe 1	22,31	22,31
axe 2	12,08	34,40
axe 3	10,02	44,42
axe 4	8,28	52,70
axe 5	7,53	60,23
axe 6	7,39	67,62
axe 7	6,68	74,30
axe 8	6,44	80,74
axe 9	5,88	86,62
axe 10	5,67	92,29
axe 11	4,03	96,31
axe 12	3,69	100,00

A partir des deux premières dimensions (axe 1 et 2), qui représentent près de 35 % de la variance, la représentation suivante a été obtenue (Figure 102).

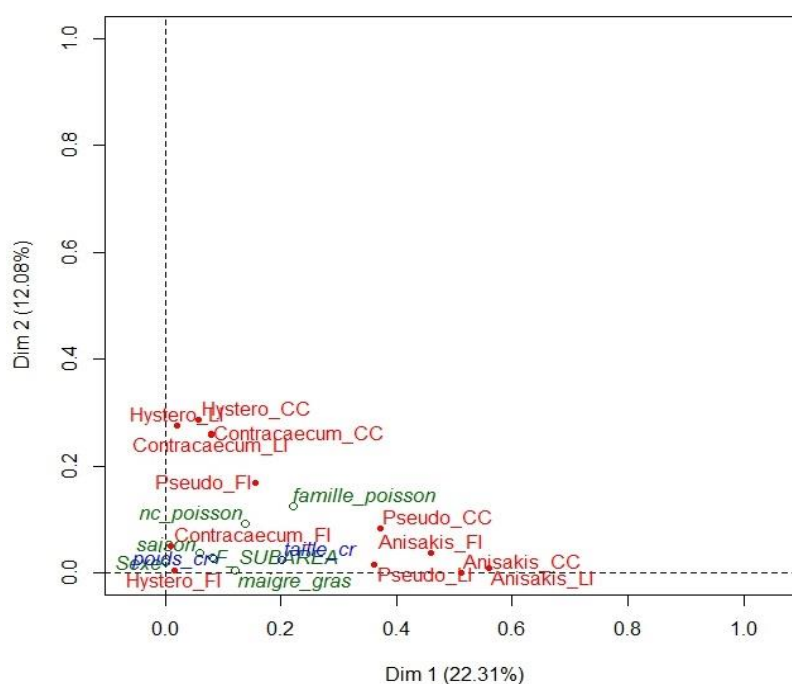


Figure 102 : Graphique des contributions des différentes variables aux axes 1 et 2 de l'analyse des correspondances Multiples.

Les variables actives de l'ACM sont en rouge, les variables supplémentaires en vert et bleu, respectivement qualitatives et quantitatives, CC : Cavité corporelle ; FI : Filets ; LI : Foie ; Pseudo : *Pseudoterranova* ; nc : espèce de poisson, cr : centré réduit

Les infestations parasitaires se démarquent globalement en trois groupes. Selon l'axe 1, le premier groupe est représenté par une infestation par *Anisakis* dans les filets, la cavité corporelle et le foie, ainsi que par *Pseudoterranova* dans la cavité corporelle et le foie, qui sont les plus forts contributeurs de cette première dimension. L'axe 2 distingue un second groupe représenté par les autres infestations parasitaires, notamment *Hysterothylacium* et *Contracaecum* dans la cavité corporelle et le foie représentant les plus forts contributeurs de cette dimension. La troisième association de variables regroupe les *Contracaecum* et *Hysterothylacium* dans les filets ainsi que les variables supplémentaires, l'ensemble de ces variables n'a pas de contribution importante sur les deux premières dimensions.

Après avoir décrit la contribution des variables, une description du nuage des individus et des différentes modalités est rendue possible (Figure 103).

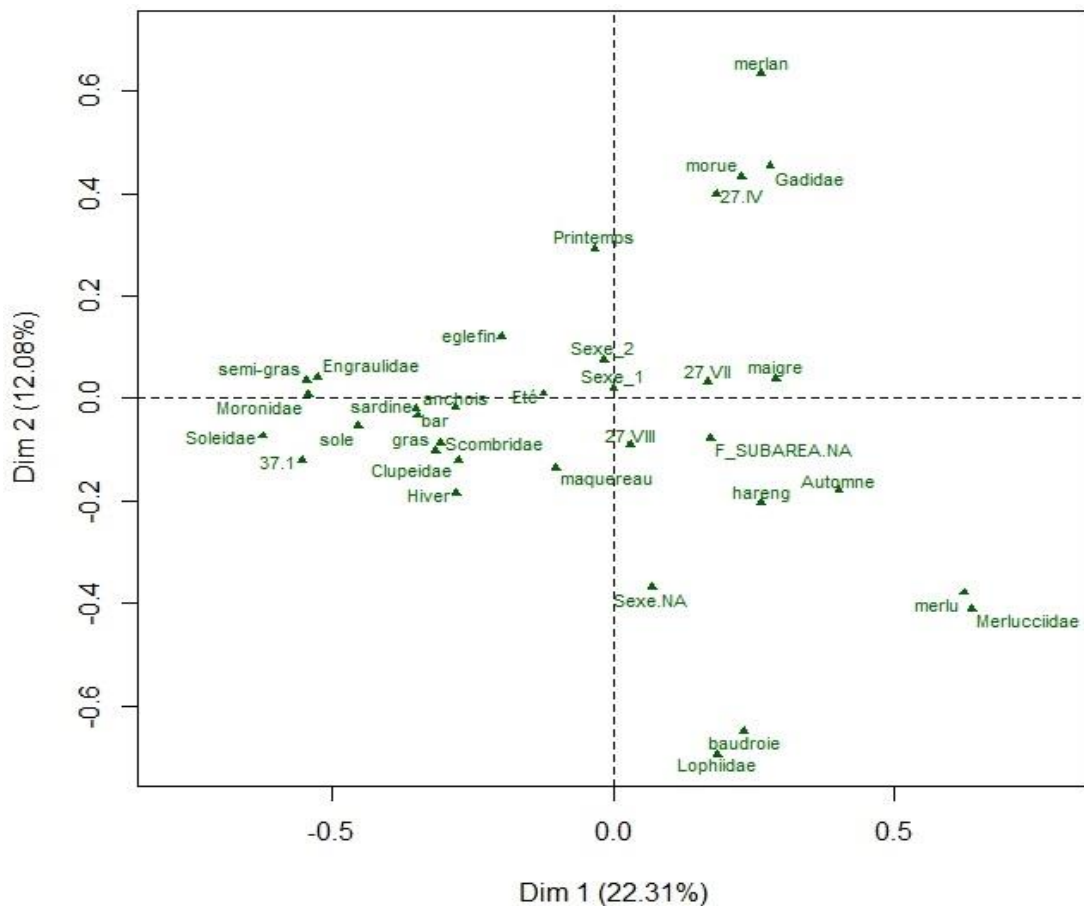


Figure 103 : Nuage des individus représentés par le point moyen de chaque modalité selon les axes 1 et 2 de l'analyse des correspondances Multiples.

Sexee_1 : mâle, Sexe_2 : femelle, sexe_NA : sexe non identifié. 37.1 : mer Méditerranée Occidentale, 27.IV : mer du Nord, 27.VII : mer d'Irlande, ouest de l'Irlande, Porcupine Bank, Manche orientale et occidentale, canal de Bristol, mer Celtique septentrionale et méridionale, et sud-ouest de l'Irlande - est et ouest, 27.VIII : golfe de Gascogne, F_Subarea NA : zone de pêche non identifiée

La combinaison du graphique des contributions (Figure 102) et la carte positionnant des nuages d'individus selon les axes un et deux (Figure 103) permettent d'expliquer l'infestation des Anisakidae. En regardant la première dimension, la prévalence d'*Anisakis* et *Pseudoterranova* dans la cavité corporelle, le foie et les filets (sauf pour *Pseudoterranova*) a été plus observée chez les poissons maigres que chez les poissons semi-gras. Ces prévalences ont plutôt été observées dans les zones 27.IV, 27.VII et 27.VIII qu'en mer Méditerranée Occidentale (37.1). Les espèces les plus parasitées appartiennent aux familles des *Merluccidae* (le merlu), *Lophiidae* (baudroie) et *Gadidae* (merlan et morue) en comparaison avec d'autres familles telles que celles des *Engraulidae* (anchois) et *Scombridae* (maquereau commun). Pour terminer, les différences de prévalence observées pour *Anisakis* et *Pseudoterranova* entre les saisons de capture sont également visibles sur la première dimension avec des poissons plus infestés en automne par rapport à ceux d'hiver, du printemps ou de l'été.

Selon la seconde dimension, l'infestation par *Hysterothylacium* et *Contracaecum* dans le foie et la cavité corporelle a été observée de façon prépondérante dans les poissons capturés au printemps par rapport aux autres saisons. Concernant les zones de pêches, ces genres de parasites ont été retrouvés de façon plus importante dans les localisations corporelles des poissons pêchés en zone 27.IV par rapport aux autres zones. Les poissons de la famille des *Gadidae*, comme par exemple le cabillaud (morue sur la carte) ou le merlan, était plus infectés par ces deux genres par rapport aux poissons de la famille des *Merluccidae* comme le merlu ou des *Lophiidae* comme la baudroie.

Après avoir étudié les deux premières dimensions, une analyse des dimensions deux et trois a été réalisée selon le même schéma que l'étude des dimensions précédentes.

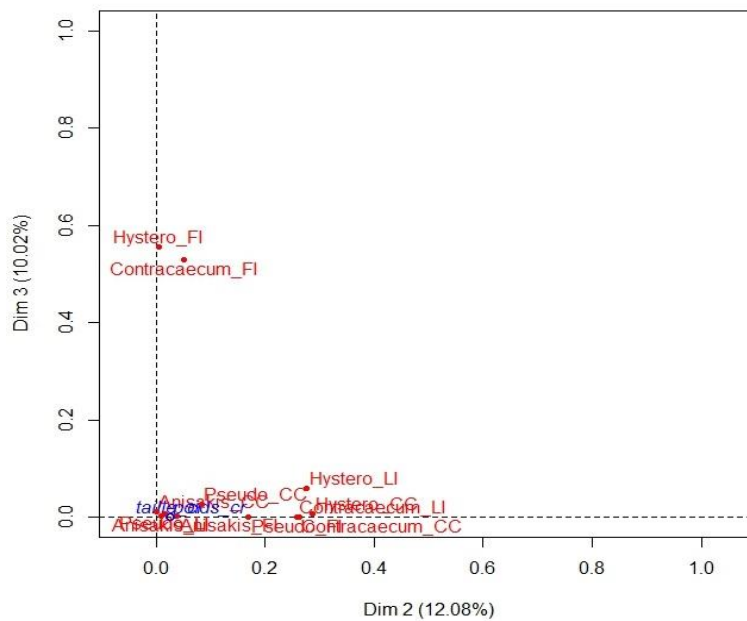


Figure 104 : Graphique des contributions des différentes variables aux axes 2 et 3 de l'analyse des correspondances Multiples.

Les variables actives sont en rouge, la variable supplémentaire qualitative est en bleu. CC : Cavité corporelle, FI : Filets, LI : Foie, Pseude : *Pseudoterranova*, nc : espèce de poisson, cr : centré réduit

Le graphe ci-dessus représente l'information supplémentaire apportée par la troisième dimension. L'infestation dans les filets par *Hysterothylacium* et *Contraeacum* contribue fortement à cette troisième dimension (Figure 104), ce qui apporte donc une information supplémentaire (en bleu, la taille des poissons).

De nouveau, suite à la description de la contribution des variables, le nuage des individus (Figure 105) peut être décrit. Ainsi, l'axe 3 permet de faiblement discriminer les individus. Les filets des poissons maigres comme ceux de la famille des *Gadidae* (églefin, merlan et cabillaud) étaient plus contaminés par ces parasites que ceux des poissons gras ou semi-gras. En termes de saisons les différences étaient relativement faibles avec une tendance de prévalence plus importante en hiver que pendant les autres saisons.

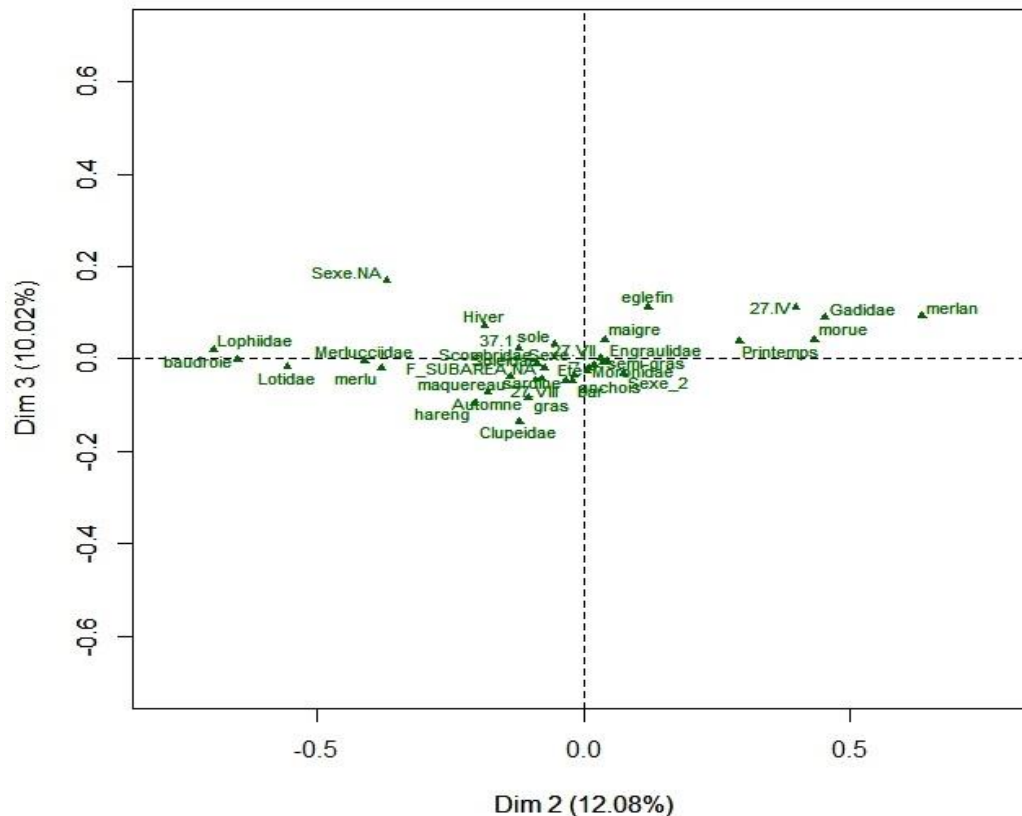


Figure 105 : Nuage des individus représentés par le point moyen de chaque modalité selon les axes 2 et 3 de l'analyse des correspondances Multiples.

Sexe_1 : mâle, Sexe_2 : femelle, sexe.NA : sexe non identifié, 37.1 : mer Méditerranée Occidentale, 27.IV : mer du Nord, 27.VII : mer d'Irlande, ouest de l'Irlande, Porcupine Bank, Manche orientale et occidentale, canal de Bristol, mer Celtique septentrionale et méridionale, et sud-ouest de l'Irlande - est et ouest, 27.VIII : golfe de Gascogne, F_Subarea NA : zone de pêche non identifiée.

IV.2.2. Application à la protection des consommateurs

Les prévalences en *Anisakis* dans les filets et la cavité corporelle, d'après l'analyse précédente, semblent très liées. La prévalence en *Pseudoterranova* dans le filet est de façon moins évidente liée à la prévalence en *Anisakis*. Comme les quantités sont plus fortes dans la cavité corporelle que dans les filets et que l'observation des parasites dans la cavité corporelle est facile à effectuer, il pourrait être intéressant d'utiliser ce paramètre pour écarter des poissons potentiellement contaminés dans le filet, par un simple examen préalable de la cavité corporelle. Ainsi, une estimation de la prévalence théorique en *Anisakis* dans les filets a pu être établie en se basant sur la quantité d'*Anisakis* trouvée dans la cavité corporelle. Pour ce faire, une régression logistique a été réalisée (Annexe 14) comme précédemment (Figure 106) sur les données d'*Anisakis* dans les filets et de la cavité corporelle des 18 espèces des poissons. En effet en l'absence de dose-réponse, on veut éviter la présence d'*Anisakis*, même en quantité faible, tant pour le risque digestif (une seule larve suffit à induire des pathologies) que pour le risque allergique. Plus la contamination (en *Anisakis*) de la cavité corporelle est élevée, plus la probabilité de trouver un filet contaminé (en *Anisakis*) augmente (Figure 106). Dans la Figure

106, notre modèle a montré que pour un poisson donné, dès qu'il y a un Anisakidae trouvé dans la cavité corporelle, il y a un risque de 20 % de présence d'un Anisakidae dans le filet. De même, s'il y a 10 Anisakidae trouvés dans la cavité corporelle, ce risque augmente de 25 %. Ce résultat est très intéressant mais le test sur la fiabilité de ce modèle n'est pas satisfaisant puisque ce modèle ne permet que 60 % de fiabilité de la présence d'*Anisakis* dans les filets par l'observation de l'intensité dans la cavité corporelle. De plus, compte-tenu des données contradictoires (Augry, 2012) sur la migration des Anisakidae de la cavité corporelle vers le muscle, cela nécessite une analyse plus approfondie. L'application de ce modèle risque d'occasionner des conclusions erronées (faux positif et faux négatif). Il pourrait y avoir un faux positif si les Anisakidae sont détectés dans la cavité mais il n'y a pas de migration vers les filets. Un faux négatif serait dans le cas où il n'y a rien dans la cavité corporelle mais, les Anisakidae ont tous déjà migré vers le muscle.

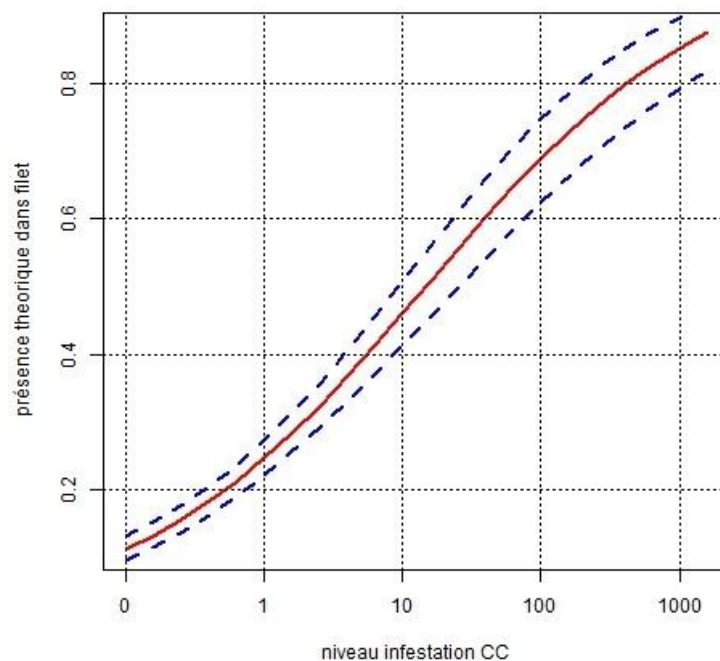


Figure 106 : Graphique représentant la prédiction de probabilité d'observer des larves d'*Anisakis* dans les filets en fonction de l'intensité en larves d'*Anisakis* (en échelle logarithmique) dans la cavité corporelle des 16 espèces de poisson contaminées par *Anisakis* dans la cavité corporelle et les filets en utilisant un modèle logistique. Ligne rouge : moyenne de prévalence, ligne pointillée bleue : intervalle de confiance à 95 % (CC : cavité corporelle).

Etudes statistiques logistiques univariées et multivariées et des correspondances multiples

- L'espèce et la taille sont des facteurs influençant le niveau de contamination des poissons en *Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets. Les autres variables influencent également le niveau de contamination mais sont trop corrélées entre elles pour pouvoir les prendre en compte dans l'analyse.
- Le sexe du poisson est le seul facteur étudié qui n'influence pas le niveau de prévalence des *Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets

Conclusions et perspectives

Cette étude métagénomique est la première au cours de laquelle un outil *HTS* a été mis au point pour l'identification des nématodes parasites isolés de poissons. La méthode d'identification des Anisakidae par séquençage à haut-débit développée durant cette thèse a permis l'identification d'un grand nombre de nématodes isolés de 16 parmi 18 espèces de poissons provenant de l'océan Atlantique Nord-Est et de la mer Méditerranée. La qualité de cette méthode a été testée et vérifiée par le pilote de séquençage avant d'effectuer l'analyse des échantillons. Au total 19 242 017 séquences issues de six runs de séquençage ont été traitées en utilisant un fragment du gène cible *COX2* d'une taille de 440 pb. Tous les outils nécessaires à la mise au point tels que l'extraction d'ADN en *pool*, la conception des amorces, le cycle de *PCR* indexée, l'élaboration de la base de données et le *pipeline* d'analyse bioinformatique *Nonnoy* ont permis la réalisation d'analyses de qualité. Malgré tout, il est connu que le séquençage *HTS* ou le séquençage de deuxième génération possèdent différentes sources de biais telles que l'extraction d'ADN, la *PCR* en point final, la *PCR* en émulsion, la survenue de chimères en utilisant des amorces universelles, il est donc important d'être rigoureux pour l'ensemble des étapes de travail. Le *pipeline* d'analyse *Nonnoy* sera disponible en ligne sur le site internet de Gènes Diffusion (<http://www.biorigami.com>). La base de données sera mise à jour dès que de nouvelles séquences d'Anisakidae seront publiées sur les banques de séquences internationales. Le public intéressé par ce *pipeline* pourra le télécharger gratuitement. Cette méthode ne constitue pas le premier développement d'une méthode d'identification *HTS* pour les nématodes mais c'est une première application aux Anisakidae. En plus de ce développement *HTS*, la détermination de la quantité d'ADN mitochondrial en *qPCR* pour trois genres d'Anisakidae de stade L3 a permis de convertir le résultat semi-quantitatif issu du *HTS* en un nombre de parasites relatif. Ceci n'a pas été réalisé dans le cas d'autres études métagénomiques ou métagénétiques publiées. Ce travail a montré une variation du nombre de mitochondries au sein d'un même genre d'Anisakidae. Cette méthode d'identification des Anisakidae en *HTS* a permis d'identifier des nématodes à moindre coût et pour un temps analytique relativement faible. Parallèlement une méthode de séquençage en *Sanger*, préprogrammée au départ du programme *Fish-Parasites*, a été réalisée dans le cas d'organes faiblement parasités.

Au total 54 383 Anisakidae ont été identifiés. Les espèces identifiées étaient issues de cinq genres: *Anisakis*, *Contraecum*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* et *Phocascaris*. Les espèces retrouvées étaient au nombre de seize : *A. simplex*, *A. pegreffii*, *A. brevispiculata*, *A. paggiae*, *A. physeteris*, *A. typica*, *A. ziphidarum*, *C. osculatum*, *C. rudolphil*, *C. mirounga*, *P. krabbei*, *P. ceticola*, *H. aduncum*, *H. deardorffoverstreetorum*, *H. reliquens*, et *Phocascaris cystophorae*. Il y a également des individus appartenant aux genres *Anisakis*, *Contraecum*, *Pseudoterranova* et *Hysterothylacium* pour lesquels

l'espèce n'a pu être déterminée. Au total 17 163 nématodes provenant de différentes localisations corporelles n'ont pas encore été identifiés.

Les Anisakidae identifiés par les 2 méthodes appartenaient au genre *Anisakis* pour le plus grand nombre avec 51 899 individus, au genre *Hysterothylacium* avec 1 555 individus, puis au genre *Pseudoterranova* avec 568 individus et au genre *Contracaecum* spp. avec 239 individus. En HTS, 47 706 nématodes provenant de 773 localisations corporelles de 295 poissons ont été identifiés. *Anisakis* spp. est le genre le plus présent avec 47 193 individus trouvés dans 438 localisations corporelles et 294 poissons. Concernant l'analyse en Sanger, 6 677 nématodes provenant de 809 poissons ont été identifiés. Les *Anisakis* spp. infestaient le plus grand nombre de poissons (4 706 nématodes identifiés dans 1 089 localisations corporelles de 648 poissons) et c'est le genre qui était présent en quantité la plus importante.

Au niveau de l'espèce, *Anisakis simplex* était largement dominant, puis *H. aduncum* et *A. pegreffii*. De plus, *Anisakis* spp. et plus précisément *A. simplex*, l'espèce la plus fréquemment identifiée dans les cas humains, étaient présentes en grande quantité dans les trois localisations corporelles principales (cavité corporelle, foie et filets), les filets étant l'organe le plus couramment consommé. Dans cette étude, *Hysterothylacium* spp. a été retrouvé habituellement dans les tubes digestifs, *Pseudoterranova* spp. était présent en grande partie dans les filets et *Contracaecum* spp. a été plutôt observé dans le foie. Les nématodes trouvés dans une localisation corporelle inhabituelle ont été *Hysterothylacium* spp., *Anisakis* spp., et *Contracaecum* spp. à la surface corporelle, *Hysterothylacium* spp. dans la bouche et *Hysterothylacium* spp. et *Anisakis* spp. dans les branchies du poisson. Ces observations sont des artefacts. En effet, un parasite très actif comme *Hysterothylacium* spp. peut se déplacer à partir du tube digestif après la mort du poisson. De même, les *Contracaecum* spp. et *Anisakis* spp. qui sont normalement plus petits et moins actifs ont pu quitter la cavité corporelle, lorsque les poissons étaient morts ou en mauvais état.

Au total, 1 795 poissons provenant de deux zones de pêche majeures : FAO 27 (océan Atlantique Nord-Est) et FAO 37 (Mer Méditerranée et mer Noire) ont été échantillonnés durant le programme *Fish-Parasites*. Parmi les 18 espèces de poisson dont l'effectif contenait au moins 20 individus, seules 16 espèces étaient contaminées par des Anisakidae : merlan, merlu, cabillaud, hareng, maquereau commun, maquereau espagnol, lingue bleue, lingue franche, baudroie, églefin, bar, lieu noir, cardine, sole, sardine, anchois. Les deux espèces non contaminées étaient le saumon atlantique (d'élevage) et la plie.

Sur les 16 espèces de poisson contaminées, 85,33 % (13 578) des localisations corporelles étaient exemptes d'Anisakidae. Il y avait seulement 10,99 % (1 749) des localisations corporelles qui étaient

contaminées et pour lesquelles les parasites ont été au moins partiellement identifiés. Au total, 42,93 % (759 individus) des poissons de 16 espèces étaient exempts d'Anisakidae, 28,62 % (578 individus) étaient parasités dans les viscères, 22,96 % (347 individus) étaient parasités à la fois dans les viscères et les filets et enfin seulement 5,49 % (84 individus) des poissons étaient parasités uniquement dans les filets. Les espèces non contaminées dans les filets étaient : la plie, la sardine, la sole, le saumon d'élevage de Norvège et le bar d'élevage du golfe du Lion.

Hormis les localisations corporelles pour lesquelles les nématodes n'ont pas été analysés, les espèces dont les filets étaient les plus contaminés par des Anisakidae étaient par ordre décroissant : lingue bleue, cardine franche, lieu noir, baudroie, merlu, lingue franche, merlan, maquereau commun, cabillaud, hareng, églefin, maquereau espagnol, bar et anchois. Pour *Anisakis* et *Pseudoterranova*, les genres rapportés comme pathogènes pour l'Homme, *Anisakis* est largement plus présent que *Pseudoterranova*, tant en termes de prévalence que d'intensité ou de diversité d'hôtes.

Des variations au niveau des prévalences au sein d'une même espèce de poisson pour une même zone de pêche et pour différentes zones de pêches ont été observées. Les espèces qui sont considérées très contaminées dans nos études sont la lingue bleue (*Molva dypterygia*), le lieu noir (*Pollachius virens*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), la baudroie (*Lophius piscatorius*), le merlan (*Merlangius merlangus*), la lingue franche (*Molva molva*) et le merlu (*Merluccius merluccius*). Les cinq premières espèces fortement parasitées dans les filets (prévalence et intensité) sont la lingue bleue (*Molva dypterygia*), le merlu (*Merluccius merluccius*), la baudroie (*Lophius piscatorius*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), le lieu noir (*Pollachius virens*) et le merlan (*Merlangius merlangus*). D'un point de vue de santé publique, ce sont des espèces nécessitant une surveillance élevée. Il faut cependant préciser que dans notre étude, ces filets ont été analysés avec flancs alors que ceux-ci sont fréquemment éliminés avant la commercialisation. Dans notre étude, certaines espèces n'étaient pas contaminées par les Anisakidae : la plie et le saumon Atlantique d'élevage. D'autres espèces étaient peu infectées telle que la sardine, le maquereau espagnol et la sole. La prévalence des Anisakidae chez la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*) a été étudiée pour la première fois.

Des différences de prévalence et de diversité parasitaire ont été observées en fonction des zones géographiques au cours de cette étude. La zone contenant le plus de diversité était la zone V.b des eaux féringiennes mais seule la lingue bleue y a été échantillonnée. Il y a au total sept espèces d'*Anisakis*, *C. osculatum*, *Phocascaris cystophorae*, *P. krabbei* provenant de la même espèce de poisson, la lingue bleue (*Molva dypterygia*). Il s'agit donc d'une sympatrie entre les espèces de parasites (partage de la même zone de répartition). Il y a également de la sympatrie entre des genres

différents d'Anisakidae dans les autres zones de pêches par exemple en mer du Nord, en mer Celtique et dans le golfe de Gascogne. Dans le golfe du Lion (37.1.2), *A. pegreffii* a été identifié mais des individus appartenant au genre *Anisakis* (sans que l'espèce soit connue) ont également été isolés dans le cadre de notre étude, *A. pegreffii* n'est donc peut-être pas la seule espèce présente dans cette zone.

Plusieurs faits nouveaux ont pu être rapportés dans ce travail. Notre étude est la première qui montre que la limite Nord de la répartition d'*A. pegreffii* s'étend au-delà des côtes ibériques puisque cette espèce infeste également la mer du Nord, la Manche et jusqu'aux eaux Féringiennes. *Anisakis paggiae* a été identifié pour la première fois chez la lingue bleue et le cabillaud dans les eaux Féringiennes. Concernant *A. ziphidarum*, il a été identifié chez la lingue bleue dans l'océan Atlantique Nord-Est. De même *Phocascaris cystophorae* a été décrit pour la première fois chez la lingue bleue dans les eaux féringiennes. Dans la zone Sud-ouest d'Irlande - Est, *Hysterothylacium reliquens* a été observé chez l'églefin et le lieu noir. Enfin, *Hysterothylacium deardorffoverstreetorum* a été identifié chez le lieu noir provenant de l'océan Atlantique Nord-Est, malheureusement la sous-zone n'a pas été précisée. *Phocascaris cystophorae* a été observé chez la lingue bleue dans les eaux féringiennes.

Pseudoterranova ceticola a également été identifié chez le cabillaud mais la zone de pêche n'est pas plus précise que l'océan Atlantique Nord-Est.

La Manche Est (27.VII.d), la mer Celtique sud (27.VII.h), le golfe de Gascogne-Nord (27.VIII.a) étaient les sous zones où il y a eu le plus de prélèvements. De plus, presque toutes les espèces de poisson de tous les lots étaient infectées par *Anisakis* et *P. krabbei* en mer Celtique centrale. La similitude d'infestation est peut-être due à la migration des poissons au sein de ces zones. Par exemple, les poissons échantillonnés dans des sous zones proches comme le sud-ouest d'Irlande-est (VII.j), la mer Celtique sud (VII.h), le golfe de Gascogne nord (VIII.a), central (VIII.b), sud (VIII.c) et au large (VIII.d) n'étaient parasités que par *A. simplex*, *A. pegreffii* et *Anisakis* ND.

Quelques observations préliminaires de l'infestation par les Anisakidae dans le merlu et le maquereau montrent que la façon d'infester d'*Anisakis* spp. chez le merlu est identique pour toutes les zones de pêches échantillonnées dans l'océan Atlantique. C'est-à-dire qu'*Anisakis* spp. infeste toujours au moins les filets, le foie et la cavité corporelle des poissons pêchés de la mer Celtique nord jusqu'au sud-ouest d'Irlande-est vers les trois zones du golfe de Gascogne avec des intensités semblables. Une même observation est réalisée avec le maquereau commun : *Anisakis* spp. infecte au moins la cavité corporelle et les filets de cette espèce en Manche Est et dans le golfe de Gascogne nord (VIII.a) et central (VIII.b). Ces deux divisions partagent la même sous-zone du golfe de Gascogne.

Les études statistiques logistiques univariée et multivariée ont permis d'étudier les facteurs influençant la prévalence d'*Anisakis* et *Pseudoterranova* dans les filets des 18 espèces de poissons. Selon l'étude univariée, les variables espèces et taille de poisson qui étaient significatives et non corrélés entre elles et entre les autres variables ont été sélectionnées afin d'effectuer l'analyse multivariée. Cette étude a permis de montrer que la variable espèce avait une forte influence sur la prévalence. La taille est également impliquée dans le niveau de prévalence. Plus le poisson est grand, plus la prévalence augmente. La zone de pêche, la famille de poisson, le type de poisson, le poids et la saison sont significatifs mais colinéaires entre eux et/ou avec la taille et l'espèce du poisson. Elles n'ont donc pas été incluses dans l'analyse multivariée. Dans cette étude univariée, le sexe n'a pas d'influence significative sur la prévalence.

D'après l'analyse des correspondances multiples sur les *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* et *Hysterothylacium* dans la cavité corporelle, le foie et les filets, la prévalence d'*Anisakis* et *Pseudoterranova* dans la cavité corporelle, le foie et les filets (sauf pour *Pseudoterranova*) dépend du type de muscles (maigre ou gras). La zone de pêche influence la prévalence (zones 27.IV, 27.VII, 27.VIII et 37.1). L'influence des saisons de capture est également visible. Les poissons sont plus infestés en automne par rapport à ceux capturés en hiver, au printemps ou en été. L'infestation par *Hysterothylacium* et *Contracaecum* dans le foie et la cavité corporelle a été observée de façon prépondérante dans les poissons capturés au printemps par rapport aux autres saisons. Concernant les zones de pêche, *Hysterothylacium* et *Contracaecum* ont été retrouvés de façon plus importante dans les localisations corporelles des poissons pêchés en zone 27.IV par rapport aux autres zones. Les poissons de la famille des *Gadidae* (cabillaud ou merlan), étaient plus infectés par *Hysterothylacium* et *Contracaecum* par rapport aux poissons de la famille des *Merluccidae* ou des *Lophiidae* (baudroie).

Les analyses logistiques uni- et multivariée et l'analyse des correspondances multiples sont deux approches statistiques différentes. Les analyses logistiques nous ont permis d'évaluer la significativité des facteurs influençant la prévalence d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova* dans les filets de 16 espèces de poissons mais aussi de mettre en évidence les colinéarités entre facteurs et les manques de notre plan d'échantillonnage. L'analyse des correspondances multiples a permis de mettre en évidence des tendances (les femelles ont une tendance à être plus infectées que les mâles, certaines familles de poisson étaient plus contaminée par certains genres de parasite que d'autres etc...) et de comparer les résultats obtenus entre les variables elles-mêmes.

L'application du modèle de prédiction des risques pour les consommateurs n'est à ce jour pas encore fiable. Ceci est probablement dû au grand nombre de données et à leur disparité. Ainsi, une analyse plus ciblée sur une espèce ou sur une plus grande zone de pêche permettra éventuellement d'obtenir une meilleure fiabilité. Malgré ces limites, ce premier résultat reste très intéressant.

Pour le travail sur l'identification des *Blastocystis* spp. et *Cryptosporidium* spp. dans les tubes digestifs de poisson du programme *ABC-Fish*, le résumé du matériels et méthodes ainsi que les résultats préliminaires sont présentés dans l'Annexe 7. Ce travail est le premier décrivant des *Blastocystis* chez les poissons. *Blastocystis* ST7 (sous-type 7), ST8 et ST10 ont été identifiés chez le hareng (*Clupea harengus*), le ST2, connu pour être ubiquitaire, a été identifié chez le maquereau commun (*Scomber scombrus*) et le merlan (*Merlangius merlangus*) et les ST 3, 4 et 8 identifiés chez le marsouin (*Monodontidae*). Parmi ces six sous-types, les cinq premiers (2, 3, 4, 7, et 8) ont déjà été identifiés chez l'Homme. De plus *Cryptosporidium molnari* et *Cryptosporidium* sp. ont été identifiés pour la première fois dans ce travail chez le lieu noir (*Pollachius virens*).

La valorisation de travail durant cette thèse se trouve dans Annexe 5

En perspectives, plusieurs travaux pourraient être menés. En ce qui concerne les résultats de séquençage, lors de la constitution de la base de données de référence, aucune séquence appartenant à *Pseudoterranova decipiens* n'a été incluse. Ainsi, les séquences attribuées à *P. krabbei* devraient être vérifiées afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas de *P. decipiens*. En *Sanger*, les résultats de concernant *Pseudoterranova* montrent que la majorité des individus appartenait à *P. decipiens*

Il serait intéressant d'analyser les séquences issues du séquençage *HTS* n'ayant abouti à aucune identification d'espèces. La construction d'arbres phylogénétiques contenant ces séquences ainsi que des séquences de référence d'Anisakidae permettra de les positionner par rapport aux espèces précédemment décrites.

Cette base de données et le *pipeline Nonnoy* seront mis en ligne gracieusement sur le site internet de la société GènesDiffusions (<http://www.biorigami.com>). Ceci permettra le partage et l'utilisation du *pipeline* par la communauté scientifique.

Dans le programme *Fish-Parasites*, les Anisakidae présents dans 2,17 % (384) des localisations corporelles n'ont pas encore été identifiés par manque de temps et de budget.

Le nombre de mitochondries des Anisakidae pourrait être déterminé pour un plus grand nombre de genres (dont *Hysterothylacium*) et pour différentes espèces. Il serait très intéressant d'analyser un plus grand nombre d'individus afin de mieux évaluer la variabilité intra-espèce et intra-genre.

Pour suivre l'évolution de la prévalence et la distribution des Anisakidae dans les poissons consommés en France, il est finalement très intéressant de récolter des données de prévalence de manière continue. Les données obtenues par le programme *Fish-Parasites* constituent la plus grande étude faite en France de façon aussi structurée du point de vue de l'annotation de la zone de pêche et des espèces de poisson échantillonnées. Il serait très intéressant également d'effectuer des études

semblables en ciblant les espèces les plus infectées et les plus consommées en France afin de préciser la répartition des Anisakidae dans ces espèces et de mieux évaluer le risque. La sélection des espèces à risque à partir de nos résultats permettrait d'obtenir des données consolidées et par conséquent, la prévention du risque pourrait être améliorée.

Références bibliographiques

Abattouy N., Valero A., Benajiba M. H., Lozano J., Martín-Sánchez J. « *Anisakis simplex* s1 parasitization in mackerel (*Scomber japonicus*) caught in the North of Morocco—prevalence and analysis of risk factors. » *Int. J. Food Microbiol.* 2011. Vol. 150, n°2, p. 136-139.

Abe N., Tominaga K., Kimata I. « Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the internal transcribed spacer region of rDNA for identification of *Anisakis simplex* complex. » *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006. Vol. 59, n°1, p. 60.

Abollo E., Gestal C., Pascual S. « *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. » *Parasitol. Res.* juin 2001. Vol. 87, n°6, p. 492-499.

Abollo E., Pascual S. « SEM study of *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1966 and *Pseudoterranova ceticola* (Deardoff and Overstreet, 1981)(Nematoda: Anisakidae), parasites of the pygmy sperm whale *Kogia breviceps*. » *Sci. Mar.* 2002. Vol. 66, n°3, p. 249-255.

Adams B. J. « Species Concepts and the Evolutionary Paradigm in Modern Nematology. » *J. Nematol.* mars 1998. Vol. 30, n°1, p. 1-21.

Adroher F. J., Valero A., Ruiz-Valero J., Iglesias L. « Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). » *Parasitol. Res.* février 1996. Vol. 82, n°3, p. 253-256.

Afssa. Avis MIC2007sa0379 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'évaluation du risque concernant la présence d'Anisakidés dans les produits de la pêche et l'extension de la dérogation à l'obligation de congélation assainissante pour les produits de la pêche dont l'alimentation est maîtrisée ainsi que pour certaines espèces de poissons sauvages. avril 2008.

Afssa. Evaluation des risques nutritionnels et sanitaires. Juillet 2004.

Alonso-Gómez A., Moreno-Ancillo A., López-Serrano M. C., Suarez-de-Parga J., Daschner A., Caballero M. T., Barranco P., Cabañas R. « *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. » *Parasitol. Res.* août 2004. Vol. 93, n°5, p. 378-384.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. « Basic local alignment search tool. » *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 215, n°3, p. 403-410.

D'Amelio S., Mathiopoulos K. D., Santos C. P., Pugachev O. N., Webb S. C., Picanço M., Paggi L. « Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. » *Int. J. Parasitol.* février 2000. Vol. 30, n°2, p. 223-226.

Anadón A. M., Romarís F., Escalante M., Rodríguez E., Gárate T., Cuéllar C., Ubeira F. M. « The *Anisakis simplex* Ani s7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. » *Clin. Exp. Immunol.* juin 2009. Vol. 156, n°3, p. 471-478.

Angelucci G., Meloni M., Merella P., Sardu F., Madeddu S., Marrosu R., Petza F., Salati F. « Prevalence of *Anisakis* spp. and *Hysterothylacium* spp. larvae in teleosts and cephalopods sampled from waters off Sardinia. » *J. Food Prot.* 2011. Vol. 74, n°10, p. 1769-1775.

Angot V. Infestation de 7 poissons de consommation courante par des larves de nématodes Anisakidés : efficacités des méthodes de filetage, conséquences sanitaires et prophylactiques. Rouen : Faculté de médecine et de pharmacie de Rouen. 1993. 287 p.

Angot V., Brasseur P. « Les larves d'Anisakidés et leur incidence sur la qualité des poissons et produits de poisson. » *Rev Med Vet.* 1995. Vol. 146, p. 791-804.

ANOFEL. Parasitologie médicale: Généralités et définitions. 2014.

Anses. Avis 2012-SA-0202 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux recommandations sur les bénéfices et les risques liés à la consommation de produits de la pêche dans le cadre de l'actualisation des repères nutritionnels du PNNS. juin 2013.

Anshary H., Sriwulan, Freeman M. A., Ogawa K. « Occurrence and Molecular Identification of *Anisakis* Dujardin, 1845 from Marine Fish in Southern Makassar Strait, Indonesia ». *Korean J. Parasitol.* 2014. Vol. 52, n°1, p. 9.

Arias-Diaz J., Zuloaga J., Vara E., Balibrea J., Balibrea J. L. « Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* larvae *in vitro*. » *Dig. Liver Dis.* janvier 2006. Vol. 38, n°1, p. 24-26.

Armentia A., Martin-Gil F., Pascual C., Martín-Esteban M., Callejo A., Martínez C. « *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. » *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2006. Vol. 16, n°4, p. 258.

Arriaza B. T., Reinhard K. J., Araújo A. G., Orellana N. C., Standen V. G. « Possible influence of the ENSO phenomenon on the pathoecology of diphyllorhynchiasis and anisakiasis in ancient Chinchorro populations. » *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2010. Vol. 105, n°1, p. 66-72.

Asaishi K., Nishino C., Totsuka M., Hayasaka H., Suzuki T. « Studies on the etiologic mechanism of anisakiasis.--2. Epidemiologic study of inhabitants and questionnaire survey in Japan. » *Gastroenterol. Jpn.* 1980. Vol. 15, n°2, p. 128.

Audebert C., Hot D., Lemoine Y., Caboche S. « Le séquençage haut-débit. Vers un diagnostic basé sur la séquence complète du génome de l'agent infectieux. » *médecine/sciences.* 2014. Vol. 30, n°12, p. 1144-1151.

Audicana L., Audicana M. T., Fernández de Corres L., Kennedy M. W. « Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. » *Vet. Rec.* 1 mars 1997. Vol. 140, n°9, p. 235.

Audicana M., Del Pozo M., Iglesias R., Ubeira F., Miliotis M., Bier J. « *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*. » *Int. Handb. Foodborne Pathog.* 2003. p. 613-636.

Audicana M. T., Ansotegui I. J., De Corres L. F., Kennedy M. W. « *Anisakis simplex*: dangerous — dead and alive? ». *Trends Parasitol.* janvier 2002. Vol. 18, n°1, p. 20-25.

Audicana M. T., Kennedy M. W. « *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. » *Clin. Microbiol. Rev.* avril 2008. Vol. 21, n°2, p. 360-379.

Augry S. Données actuelles sur les anisakidés et l'anisakidose. Thèse de médecine vétérinaire. Nantes : Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation ; Université de Nantes. avril 2012. 232 p.

- Baeza M. L., Conejero L., Higaki Y., Martin E., Perez C., Infante S., Rubio M., Zubeldia J. M. « *Anisakis simplex* allergy: a murine model of anaphylaxis induced by parasitic proteins displays a mixed Th1/Th2 pattern. » *Clin. Exp. Immunol.* décembre 2005. Vol. 142, n°3, p. 433-440.
- Bak T.-J., Jeon C.-H., Kim J.-H. « Occurrence of anisakid nematode larvae in chub mackerel (*Scomber japonicus*) caught off Korea. » *Int. J. Food Microbiol.* novembre 2014. Vol. 191, n°0, p. 149-156.
- Bergmann G. T., Motta P. J. « Infection by anisakid nematodes *Contracaecum* spp. in the Mayan cichlid fish '*Cichlasoma (Nandopsis) urophthalmus* (Günther 1862). » *J. Parasitol.* 2004. Vol. 90, n°2, p. 405-407.
- Berland B. *Hysterothylacium aduncum* (nématode) chez les poissons. [s.l.] : Conseil International pour l'Exploitation de la Mer, 1991.
- Berland B. « Are parasites always harmful. » *Proc. 3rd Eur. Multicollloqium Parasitol. Camb. UK* 7 13 Sept. 1980.
- Berland B. « Nematodes from some Norwegian marine fishes. » *Sarsia* 1961. Vol. 2, n°1, p. 1-50.
- Bernardi C. « Preliminary study on prevalence of larvae of Anisakidae family in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). » *Food Control* avril 2009. Vol. 20, n°4, p. 433-434.
- Bernardi C., Gustinelli A., Fioravanti M. L., Caffara M., Mattiucci S., Cattaneo P. « Prevalence and mean intensity of *Anisakis simplex* (*sensu stricto*) in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Northeast Atlantic Ocean. » *Int. J. Food Microbiol.* juillet 2011. Vol. 148, n°1, p. 55-59.
- Blouin M. S. « Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA *versus* internal transcribed spacer. » *ASP Spec.* mai 2002. Vol. 32, n°5, p. 527-531.
- Boily F., Marcogliese D. J. « Geographical variations in abundance of larval anisakine nematodes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) from the Gulf of St. Lawrence. » *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1995. Vol. 52, n°S1, p. 105-115.
- Boireau P., Guillot J., Polack B., Vallée I., Chermette R. « Risques parasitaires liés aux aliments d'origine animale. » *Rev. Fr. Lab.* 2002. Vol. 2002, n°348, p. 71-89.
- Borges J. N., Cunha L. F. G., Santos H. L. C., Monteiro-Neto C., Santos C. P. « Morphological and Molecular Diagnosis of Anisakid Nematode Larvae from Cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the Coast of Rio de Janeiro, Brazil. » *PLoS ONE* juillet 2012. Vol. 7, n°7, p. e40447.
- Bouree P., Paugam A., Petithory J. C. « Anisakidosis: report of 25 cases and review of the literature. » *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* février 1995. Vol. 18, n°2, p. 75-84.
- Bratley J., Bishop C. A. « Larval *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridoidea) infection in the musculature of Atlantic cod, *Gadus morhua*, from Newfoundland and Labrador. » *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1992. Vol. 49, n°12, p. 2635-2647.
- Bratley J., Clark K. J. « Effect of temperature on egg hatching and survival of larvae of *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascaridoidea). » *Can. J. Zool.* 1992. Vol. 70, n°2, p. 274-279.

- Bratney J., Stenson G. B. « Host specificity and abundance of parasitic nematodes (Ascaridoidea) from the stomachs of five phocid species from Newfoundland and Labrador. » *Can. J. Zool.* 1993. Vol. 71, n°11, p. 2156-2166.
- Bristow G. A., Berland B. « On the ecology and distribution of *Pseudoterranova decipiens* C (Nematoda: Anisakidae) in an intermediate host, *Hippoglossoides platessoides*, in northern Norwegian waters. » *Int. J. Parasitol.* avril 1992. Vol. 22, n°2, p. 203-208.
- Brooks D. R., Hoberg E. P. « How will global climate change affect parasite–host assemblages? » *Trends Parasitol.* 2007. Vol. 23, n°12, p. 571-574.
- Brutti A., Rovere P., Cavallero S., D’Amelio S., Danesi P., Arcangeli G. « Inactivation of *Anisakis simplex* larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments. » *Food Control.* 2010. Vol. 21, n°3, p. 331-333.
- Bush A. O., Lafferty K. D., Lotz J. M., Shostak A. W. « Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. » *J. Parasitol.* août 1997. Vol. 83, n°4, p. 575-583.
- Butt A. A., Aldridge K. E., Sander C. V. « Infections related to the ingestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety. » *Lancet Infect. Dis.* mai 2004. Vol. 4, n°5, p. 294-300.
- Caballero M. L., Moneo I. « Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. » *Parasitol. Res.* juin 2004. Vol. 93, n°3, p. 248-251.
- Caboche S., Audebert C., Hot D. « High-Throughput Sequencing, a versatile weapon to support genome-based diagnosis in infectious diseases: applications to clinical bacteriology. » *Pathogens* avril 2014. Vol. 3, n°2, p. 258-279.
- Campana-Rouget Y., Biocca E. « Une nouvelle espèce d’*Anisakis* chez un phoque méditerranéen. » *Ann. Parasitol. Hum. Comparée.* 1955. Vol. 30, p. 477-480.
- Cavallero S., Costa A., Caracappa S., Gambetta B., D’Amelio S. « Putative hybrids between two *Anisakis* cryptic species: Molecular genotyping using High Resolution Melting. » *Exp. Parasitol.* novembre 2014. Vol. 146, n°0, p. 87-93.
- Cavallero S., Nadler S. A., Paggi L., Barros N. B., D’Amelio S. « Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. » *Parasitol. Res.* avril 2011. Vol. 108, n°4, p. 781-792.
- Cespedes M., Saez A., Rodriguez I., Pinto J., Rodriguez R. « Chronic anisakiasis presenting as a mesenteric mass. » *Abdom. Imaging.* 2000. Vol. 25, n°5, p. 548-550.
- CEVPM. Etude de la fréquence d’infestation de filets de harengs par la larve d’*Anisakis simplex*. Mai 1993.
- Chai J. Y., Guk S. M., Sung J. J., Kim H. C., Park Y. M. « Recovery of *Pseudoterranova decipiens* (Anisakidae) larvae from codfish of the Antarctic Ocean. » *Korean J. Parasitol.* 1995. Vol. 33, n°3, p. 231.
- Chaligiannis I., Lalle M., Pozio E., Sotiraki S. « Anisakidae infection in fish of the Aegean Sea. » *Vet. Parasitol.* mars 2012. Vol. 184, n°2-4, p. 362-366.

Chen H.-Y., Shih H.-H. « Occurrence and prevalence of fish-borne *Anisakis* larvae in the spotted mackerel *Scomber australasicus* from Taiwanese waters. » *Acta Trop.* 2015. Vol. 145, p. 61-67.

Chen Q., Yu H. Q., Lun Z. R., Chen X. G., Song H. Q., Lin R. Q., Zhu X. Q. « Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potential. » *Parasitol. Res.* décembre 2008. Vol. 104, n°1, p. 79-84.

Chord-Auger S., Miegerville M., Le Pape P. « L'anisakiase dans la région Nantaise: de l'étal du poissonnier au cabinet du médecin. » *Parasite.* 1995. Vol. 2, n°4, p. 395-400.

Cho S.-H., Lee S.-E., Park O.-H., Na B.-K., Sohn W.-M. « Larval Anisakid Infections in Marine Fish from Three Sea Areas of the Republic of Korea. » *Korean J. Parasitol.* 2012. Vol. 50, n°4, p. 295.

Ciccarelli C., Aliventi A., Di Trani V., Semeraro A. « Assessment of the prevalence of Anisakidae larvae prevalence in anchovies in the central Adriatic sea. » *Ital. J. Food Saf.* 2011. Vol. 1, n°1, p. 15-19.

Cocheton J.-J., Cabou I., Lecomte I. « Anisakiase et infections par les Anisakidés. » In : *Annales de médecine interne.* [s.l.] : Masson, 1991. p. 121-130. ISBN : 0003-410X.

Codex alimentarius, Codex STAN 167-1989. Standard for salted fish and dried salted fish of the Gadidae family of fish, Codex STAN 167-1989. 1989.

Codex alimentarius, Codex STAN 244-2004. Standard for salted Atlantic herring and salted sprat, Codex STAN 244-2004. 2004.

Codex alimentarius, Codex STAN 311-2013. Standard for smoked fish, smoked-favoured fish and smoked-dried fish Codex STAN 311-2013. 2013.

Communauté européenne. Règlement (CE) N° 2074/2005 de la commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) N° 854/2004 du parlement européen et du Conseil (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) n° 853/2004 et (CE) N° 854/2004. Décembre 2005a.

Communauté européenne. Règlement (CE) No 178/2002 du parlement européen et du conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. 28 janvier 2002.

Communauté européenne. Règlement (CE) N° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires. avril 2004a.

Communauté européenne. Règlement (CE) N° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. 15 novembre 2005b.

Communauté européenne. Règlement (CE) N° 853/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 Fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. avril 2004b.

Communauté européenne. Règlement (CE) N° 854/2004 du Parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. avril 2004c.

Costa G., Madeira A., Pontes T., D'Amelio S. « Anisakid nematodes of the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Madeiran waters, Portugal. » *Acta Parasitol.* 2004. Vol. 49, n°2, p. 156-161.

Costa G., Pontes T., Mattiucci S., D'Amélio S. « The occurrence and infection dynamics of *Anisakis* larvae in the black-scabbard fish, *Aphanopus carbo*, chub mackerel, *Scomber japonicus*, and oceanic horse mackerel, *Trachurus picturatus* from Madeira, Portugal. » *J. Helminthol.* 2003. Vol. 77, n°02, p. 163-166.

Cotton R. G. Mutation detection. [s.l.] : Wiley Online Library, 1997. ISBN : 0-470-01590-X.

Cremonte F., Sardella N. H. « The parasita fauna of *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 (Pisces: Scombridae) in two zones of the Argentine Sea. » *Fish. Res.* 1997. Vol. 31, n°1, p. 1-9.

Cruz C., Barbosa C., Saraiva A. « Distribution of larval anisakids in blue whiting off Portuguese fish market. » *Helminthologia.* 2007. Vol. 44, n°1, p. 21-24.

Cuende E., Audicana M., Garcia M., Anda M., Fernández C. L., Jimenez C., Vesga J. « Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. » *Clin. Exp. Rheumatol.* 1997. Vol. 16, n°3, p. 303-304.

Darby B. J., Todd T. C., Herman M. A. « High-throughput amplicon sequencing of rRNA genes requires a copy number correction to accurately reflect the effects of management practices on soil nematode community structure. » *Mol. Ecol.* novembre 2013. Vol. 22, n°21, p. 5456-5471.

Dawkins H. J. S., Spencer T. L. « The isolation of nucleic acid from nematodes requires an understanding of the parasite and its cuticular structure. » *Parasitol. Today* mars 1989. Vol. 5, n°3, p. 73-76.

Deardorff T. L., Kent M. L. « Prevalence of larval *Anisakis simplex* in pen-reared and wild-caught salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington. » *J. Wildl. Dis.* 1989. Vol. 25, n°3, p. 416-419.

Deardorff T. L., Overstreet R. M. « *Contraecaecum multipapillatum* (= *C. robustum*) from fishes and birds in the northern Gulf of Mexico. » *J. Parasitol.* 1980. p. 853-856.

DGAL, Direction de la qualité. Parasite des poissons. *Anisakis* et Anisakiase. 25 janvier 1980.

DGAL/SDSSA. Instruction technique DGAL/SDSSA/2014-576 Exigences réglementaires concernant les parasites dans les produits de la mer et d'eau douce – Conduite à tenir au niveau de l'inspection. 15 juillet 2014.

DGAL/SDSSA/N2010-8179. Opération Interministérielle Vacances : Opération Alimentation Vacances 2010. juin 2010.

DGAL/SDSSA/N2010-8295. Bilan de l'Opération Interministérielle Vcances-Opération Alimentation Vacances 2010. 2 novembre 2010.

DGAL/SDSSA/N2011-8117. Application de l'arrêté du 21 décembre 2009 relatif aux règles sanitaires applicables aux activités de commerce de détail, d'entreposage et de transport de produit d'origine animale et denrées alimentaires en contenant. mai 2011.

DGAL/SDSSA/N2011-8140. Opération Interministérielle Vacances : Opération Alimentaire Vacances 2011. juin 2011.

DGAL/SDSSA/N2012-8126. Opération Interministérielle Vacances : Opération Alimentation Vacances 2012. juin 2012.

DGAL/SDSSA/SDSPA/N2008-8145. Opération Interministérielle Vacances : Opération Alimentation Vacances et Opération Protection Animale Vacances 2008. juin 2008.

Dias F. J. E., São Clemente S. C., Pinto R. M., Knoff M. « Anisakidae nematodes and *Trypanorhyncha* cestodes of hygienic importance infecting the king mackerel *Scomberomorus cavalla* (Osteichthyes: Scombridae) in Brazil. » *Vet. Parasitol.* février 2011. Vol. 175, n°3-4, p. 351-355.

Diesing K. M. *Revision der nematoden.* [s.l.] : KK Hof-und staatsdruckerei, 1861.

Dorny P., Praet N., Deckers N., Gabriel S. « Emerging food-borne parasites. » *Vet. Parasitol.* 2009. Vol. 163, n°3, p. 196-206.

Dupouy-Camet J., Gay M., Bourgau O., Nouchi A., Léger E., Dei-Cas E. « L'atteinte œsophagienne : une complication rare de l'anisakidose à *Pseudoterranova*. » *La Presse Médicale* janvier 2014. Vol. 43, n°1, p.81-83

Dupouy-Camet J., Touabet-Azouzi N., Fréal E., Van Cauteren D., Yera H., Moneret-Vautrin A. Incidence de l'anisakidose en France. Enquête rétrospective 2010-2014. Bulletin Epidémiologique Santé animale Alimentation 2015. soumis.

Efsa. « Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. » *EFSA J.* 2010. Vol. 8, n°4, 91 p.

Espiñeira M., Herrero B., Vieites J. M., Santaclara F. J. « Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS-1 region. » *Food Control* juillet 2010. Vol. 21, n°7, p. 1051-1060.

Esposito A., Kirschberg M. « How many 16S-based studies should be included in a metagenomic conference? It may be a matter of etymology. » *FEMS Microbiol. Lett.* février 2014. Vol. 351, n°2, p. 145-146.

Fang W., Liu F., Zhang S., Lin J., Xu S., Luo D. « *Anisakis pegreffii*: a quantitative fluorescence PCR assay for detection *in situ*. » *Exp. Parasitol.* février 2011. Vol. 127, n°2, p. 587-592.

Fang W., Xu S., Zhang S., Wang Y., Chen X., Luo D. « Multiple primer PCR for the identification of anisakid nematodes from Taiwan Strait. » *Exp. Parasitol.* février 2010. Vol. 124, n°2, p. 197-201.

FAO. *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture.* 2014.

Farjallah S., Slimane B. B., Busi M., Paggi L., Amor N., Blel H., Said K., D'Amelio S. « Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. » *Parasitol. Res.* février 2008. Vol. 102, n°3, p. 371-379.

- Farjallah S., Slimane B., Blel H., Amor N., Said K. « Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the eastern Mediterranean coasts in Tunisia. » *Parasitol. Res.* décembre 2006. Vol. 100, n°1, p. 11-17.
- Food and Drug Administration. « Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 4th Ed. Washington, DC: Department of Health and Human Services. » *Food Drug Adm. Cent. Food Saf. Appl. Nutr.* 2011.
- FranceAgriMer. *Données et bilans consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2014.* Mai 2015.
- FranceAgriMer. *Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.* [s.l.] : FranceAgriMer, 2013.
- Fumarola L., Monno R., Ierardi E., Rizzo G., Giannelli G., Lalle M., Pozio E. « *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women ». *Foodborne Pathog. Dis.* novembre 2009. Vol. 6, n°9, p. 1157-1159.
- Garbin L., Mattiucci S., Paoletti M., González-Acuña D., Nascetti G. « Genetic and morphological evidences for the existence of a new species of *Contraecaecum* (Nematoda: Anisakidae) parasite of *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) from Chile and its genetic relationships with congeners from fish-eating birds. » *J. Parasitol.* juin 2011. Vol. 97, n°3, p. 476-492.
- Gasser R. B., Monti J. R. « Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. » *Mol. Cell. Probes* juin 1997. Vol. 11, n°3, p. 201-209.
- George-Nascimento M., Urrutia X. « *Pseudoterranova cattani* sp. nov. (Ascaridoidea: Anisakidae), un parásito del lobo marino común *Otaria byronia* De Blainville en Chile. » *Rev. Chil. Hist. Nat.* 2000. Vol. 73, n°1, p. 93-98.
- Glenn T. C. « Field guide to next-generation DNA sequencers. » *Mol. Ecol. Resour.* septembre 2011. Vol. 11, n°5, p. 759-769.
- Gómez B., Lasa E., Arroabarren E., Garrido S., Anda M., Tabar A. I. « Alergia a *Anisakis simplex*. » *An. Sist. Sanit. Navar.* 15 décembre 2008. Vol. 26, n°0, p. 25-30.
- Gopar-Merino L., Osorio-Sarabia D., García-Prieto L. « A new species of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) parasite of *Ariopsis guatemalensis* (Osteichthyes: Ariidae) from Tres Palos lagoon, Mexico. » *J. Parasitol.* 2005. Vol. 91, n°4, p. 909-914.
- Goto C., Kasuya S., Koga K., Ohtomo H., Kagei N. « Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae *in vitro*. » *Parasitol. Res.* août 1990. Vol. 76, n°8, p. 653-656.
- Gutiérrez-Galindo J. F., Osanz-Mur A. C., Mora-Ventura M. T. « Occurrence and infection dynamics of anisakid larvae in *Scomber scombrus*, *Trachurus trachurus*, *Sardina pilchardus*, and *Engraulis encrasicolus* from Tarragona (NE Spain). » *Food Control.* 2010. Vol. 21, n°11, p. 1550-1555.
- Hafsteinsson H., Rizvi S. S. « A Review of the Sealworm Problem: Biology, Implications and Solutions. » *J. Food Prot.* 1987. Vol. 50, n°1, p. 70-84.

Harismendy O., Ng P. C., Strausberg R. L., Wang X., Stockwell T. B., Beeson K. Y., Schork N. J., Murray S. S., Topol E. J., Levy S., Frazer K. A. « Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. » *Genome Biol.* 2009. Vol. 10, n°3, p. R32.

Hartwich, G. 1974. Keys to the genera of the Ascaridoidea, p. 1 -27. *In*: Anderson, Chabaud & Willmott (Eds). CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates 2. England, Commonwealth Institute of Helminthology, Headly Brothers Ltd, London. 1974. n°2, p1-27

Hartwich G. 1964. Revision der vogelparasitischen Nematoden Mitteleuropas II. Die Gattung *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 (Ascaridoidea) Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin, 40, 15-53.

Hauksson E. « The prevalence, abundance, and density of *Pseudoterranova* sp.(p) larvae in the flesh of cod (*Gadus morhua*) relative to proximity of grey seal (*Halichoerus grypus*) colonies on the coast off Drangar, Northwest Iceland. » *J. Mar. Biol.* 2011. Vol. 2011,.

Hauksson E., Karlsson H., Eliasson K. « Decreases in anisakid nematodes abundance and density in cod, kept in on-growing sea-cages. » *Adv. Stud. Biol.* 2012. Vol. 4, n°5, p. 217-230.

Hee-Jung K., Park C., Seung-Yull C. « A case of extragastrointestinal anisakiasis involving a mesocolic lymph node. » *Korean J. Parasitol.* 1997. Vol. 35, n°1, p. 63-66.

Hemmingsen W., Halvorsen O., MacKenzie K. « The occurrence of some metazoan parasites of Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in relation to age and sex of the host in Balsfjord (70 N), North Norway. » *Polar Biol.* 2000. Vol. 23, n°5, p. 368-372.

Hermida M., Mota R., Pacheco C., Santos C., Cruz C., Saraiva A., Tamagnini P. « Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Portuguese waters. » *Parasitol. Res.* mai 2012. Vol. 110, n°5, p. 1919-1928.

Hernandez-Prera J. C., Polydorides A. D. « Anisakidosis of the sigmoid colon disguising as metastatic carcinoma: A case report and review of the literature. » *Pathol. - Res. Pract.* juillet 2012. Vol. 208, n°7, p. 433-435.

Herrerias M., Aznar F. J., Balbuena J. A., Raga J. A. « Anisakid larvae in the musculature of the Argentinean hake, *Merluccius hubbsi*. » *J. Food Prot.* 2000. Vol. 63, n°8, p. 1141-1143.

Hierro I., Valero A., Navarro M. C. « *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. » *Phytomedicine* juillet 2006. Vol. 13, n°7, p. 527-531.

Hochberg N. S., Hamer D. H. « Anisakidosis: Perils of the deep. » *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* octobre 2010. Vol. 51, n°7, p. 806-812.

Huang W. « Anisakidés et anisakidoses humaines. II: Enquête sur les anisakidés de poissons commerciaux du marché parisien. » *Ann. Parasitol. Hum. Comparée.* 1988. Vol. 63, n°3, p. 197-208.

Hubert B., Belvèze H., Bacou J. « L'anisakiase en France (1985-1987). » *BEH.* 1987. Vol. 48, p. 189-191.

Hu M., D'Amelio S., Zhu X., Paggi L., Gasser R. « Mutation scanning for sequence variation in three mitochondrial DNA regions for members of the *Contraecum osculatum* (Nematoda: Ascaridoidea) complex. » *Electrophoresis*. 2001. Vol. 22, n°6, p. 1069-1075.

Iglesias L., Malagón D., Valero A., Benítez R., Javier Adroher F. « CO₂-fixing enzymes during moulting from third larval to fourth larval stage of *Anisakis simplex* and *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae). » *Parasitol. Res.* juin 2005. Vol. 96, n°4, p. 212-215.

Institut de veille sanitaire. «Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France». juin 2003.

Ishiguro A., Uno Y., Ishiguro Y., Sakuraba H., Munakata A. « *Anisakiasis* of the ileocecal valve. » *Gastrointest. Endosc.* 2001. Vol. 53, n°6, p. 677-679.

Jeon C.-H., Kim J.-H. « Pathogenic potential of two sibling species, *Anisakis simplex* (ss) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): *in vitro* and *in vivo* studies. » *BioMed Res. Int.* 2015. Vol. 2015,.

Jofré L., Neira P., Noemí I., Cerva J. L. « Pseudoterranovosis y sushi. » *Rev. Chil. Infectol.* 2008. Vol. 25, n°3, p. 200-205.

Kanarek G., Bohdanowicz J. « Larval *Contraecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in the Great Cormorant [*Phalacrocorax carbo* (L., 1758)] from north-eastern Poland: a morphological and morphometric analysis. » *Vet. Parasitol.* décembre 2009. Vol. 166, n°1-2, p. 90-97.

Karl H., Baumann F., Ostermeyer U., Kuhn T., Klimpel S. « *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. » *Dis. Aquat. Organ.* mai 2011. Vol. 94, n°3, p. 201-209.

Karl H., Leinemann M. « A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. » *Arch Leb.* 1993. Vol. 44, n°5, p. 105-128.

Karl H., Levsen A. « Occurrence and distribution of anisakid nematodes in Grey gurnard (*Eutrigla gurnardus* L.) from the North Sea. » *Food Control* octobre 2011. Vol. 22, n°10, p. 1634-1638.

Karl H., Roepstorff A., Huss H. H., Bloemsmas B. « Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. » *Int. J. Food Sci. Technol.* 1994. Vol. 29, n°6, p. 661-670.

Kennedy M. W., Harnett W. «Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology». [s.l.] : CABI, 2013. ISBN : 1-84593-759-7.

Khalil L. « Larval nematodes in the herring (*Clupea harengus*) from British coastal waters and adjacent territories. » *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 1969. Vol. 49, n°03, p. 641-659.

Khan R., Chandra C. « Influence of climatic changes on the parasites of Atlantic cod *Gadus morhua* off coastal Labrador, Canada. » *J. Helminthol.* 2006. Vol. 80, n°02, p. 193-197.

Kim S.-G., Jo Y.-J., Park Y.-S., Kim S.-H., Song M.-H., Lee H.-H., Kim J.-S., Ryou J.-W., Joo J.-E., Kim D.-H. « Four cases of gastric submucosal mass suspected as anisakiasis. » *Korean J. Parasitol.* mars 2006. Vol. 44, n°1, p. 81-86.

Klapper R., Kuhn T., Münster J., Levsen A., Karl H., Klimpel S. « Anisakid nematodes in beaked redfish (*Sebastes mentella*) from three fishing grounds in the North Atlantic, with special notes on distribution in the fish musculature. » *Vet. Parasitol.* janvier 2015. Vol. 207, n°1-2, p. 72-80.

Kliks M. M. « Human anisakiasis: an update. » *JAMA.* 1986. Vol. 255, n°19, p. 2605-2605.

Klimpel S., Kellermanns E., Palm H. « The role of pelagic swarm fish (*Myctophidae: Teleostei*) in the oceanic life cycle of *Anisakis* sibling species at the Mid-Atlantic Ridge, Central Atlantic. » *Parasitol. Res.* décembre 2008. Vol. 104, n°1, p. 43-53.

Klimpel S., Palm H., Rückert S., Piatkowski U. « The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). » *Parasitol. Res.* septembre 2004. Vol. 94, n°1, p. 1-9.

Klimpel S., Palm H. W. « Anisakid nematode (Ascaridoidea) life cycles and distribution: increasing zoonotic potential in the time of climate change? ». In : Mehlhorn H (éd.). *Prog. Parasitol.* [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 201-222. ISBN : 978-3-642-21395-3.

Klimpel S., Palm H. W., Busch M. W., Kellermanns E., Rückert S. « Fish parasites in the Arctic deep-sea: Poor diversity in pelagic fish species vs. heavy parasite load in a demersal fish. » *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 2006. Vol. 53, n°7, p. 1167-1181.

Klimpel S., Rückert S. « Life cycle strategy of *Hysterothylacium aduncum* to become the most abundant anisakid fish nematode in the North Sea. » *Parasitol. Res.* septembre 2005. Vol. 97, n°2, p. 141-149.

Knoff M., Felizardo N. N., Iñiguez A. M., Maldonado Jr A., Torres E. J. L., Pinto R. M., Gomes D. C. « Genetic and morphological characterisation of a new species of the genus *Hysterothylacium* (Nematoda) from *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) of the Neotropical Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. » *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* mars 2012. Vol. 107, n°2, p. 186-193.

Køie M. « Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802)(Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). » *Can. J. Zool.* 1993. Vol. 71, n°7, p. 1289-1296.

Køie M., Fagerholm H.-P. « The life cycle of *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) *sensu stricto* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in view of experimental infections. » *Parasitol. Res.* juin 1995. Vol. 81, n°6, p. 481-489.

Koinari M., Karl S., Elliot A., Ryan U., Lymbery A. J. « Identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) in marine fish hosts from Papua New Guinea. » *Vet. Parasitol.* mars 2013. Vol. 193, n°1-3, p. 126-133.

Levsen A., Lunestad B. T. « *Anisakis simplex* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. » *Vet. Parasitol.* août 2010. Vol. 171, n°3-4, p. 247-253.

Levsen A., Lunestad B. T., Berland B. « Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. » *J. Food Prot.* 1 avril 2005. Vol. 68, n°4, p. 828-832.

Levsen A., Midthun E. « Occurrence and spatial distribution of *Anisakis* sp. in three commercially important pelagic fish stocks from the NE Atlantic, with comments on the significance to consumer safety. » *Parassitologia.* 2007. Vol. 2, p. 402-403.

Liberato C. D., Bossù T., Scaramozzino P., Nicolini G., Ceddia P., Mallozzi S., Cavallero S., D'Amelio S. « Presence of Anisakid Larvae in the European Anchovy, *Engraulis encrasicolus*, Fished Off the Tyrrhenian Coast of Central Italy. » *J. Food Prot.* septembre 2013. Vol. 76, n°9, p. 1643-1648.

Li L., Xu Z., Zhang L. « A new species of genus *Hysterothylacium* Ward et Magath, 1917 (Nematoda, Anisakidae) from *Liparis tanakae* (Scorpaeniformes, Liparidae) from the Yellow Sea, China. » *Acta Parasitol.* 2007. Vol. 52, n°4, p. 371-375.

Llarena-Reino M., González Á. F., Vello C., Outeiriño L., Pascual S. « The accuracy of visual inspection for preventing risk of *Anisakis* spp. infection in unprocessed fish. » *Food Control.* 2012. Vol. 23, n°1, p. 54-58.

Lopes L. P. C., Pimpão D. M., Takemoto R. M., Malta J. C. O., Varella A. M. B. « *Hysterothylacium* larvae (Nematoda, Anisakidae) in the freshwater mussel *Diplodon suavidicus* (Lea, 1856) (Mollusca, Unioniformes, Hyriidae) in Aripuanã River, Amazon, Brazil. » *J. Invertebr. Pathol.* mars 2011. Vol. 106, n°3, p. 357-359.

Lopez I., Pardo M. A. « Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products. » *J. Agric. Food Chem.* février 2010. Vol. 58, n°3, p. 1469-1477.

Lorenzo S., Iglesias R., Leiro J., Ubeira F., Ansotegui I., Garcia M., Fernández de Corres L. « Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. » *Allergy.* 2000. Vol. 55, n°7, p. 627-633.

Lunestad B. T. « Absence of nematodes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. » *J. Food Prot.* janvier 2003. Vol. 66, n°1, p. 122-124.

Lunneryd S.-G., Boström M., Aspholm P. « Sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infection in grey seals (*Halichoerus grypus*), cod (*Gadus morhua*) and shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) in the Baltic Sea. » *Parasitol. Res.* janvier 2015. Vol. 114, n°1, p. 257-264.

Maggi P., Caputi-Iambrenghi O., Scardigno A., Scoppetta L., Saracino A., Valente M., Pastore G., Angarano G. « Gastrointestinal infection due to *Anisakis simplex* in southern Italy. » *Eur. J. Epidemiol.* 2000. Vol. 16, n°1, p. 75-78.

Magnaval J.-F., Berry A., Nadrigny M. « Choc anaphylactique révélant une anisakiase. » *Presse Médicale.* 2002. Vol. 31, n°28, p. 1309-1311.

Ma H. W., Jiang T. J., Quan F. S., Chen X. G., Wang H. D., Zhang Y. S., Cui M. S., Zhi W. Y., Jiang D. C. « The infection status of anisakid larvae in marine fish and cephalopods from the Bohai Sea, China and their taxonomical consideration. » *Korean J. Parasitol.* 1997. Vol. 35, n°1, p. 19.

Manfredi M., Crosa G., Galli P., Ganduglia S. « Distribution of *Anisakis simplex* in fish caught in the Ligurian Sea. » *Parasitol. Res.* 2000. Vol. 86, n°7, p. 551-553.

Marques J. F., Cabral H. N., Busi M., D'Amelio S. « Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. » *J. Helminthol.* 2006. Vol. 80, n°01, p. 47-51.

Martín-Sánchez J., Díaz M., Artacho E. M., Valero A. « Molecular arguments for considering *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) a complex of sibling species. » *Parasitol. Res.* 2003. Vol. 89, n°3, p. 214-220.

Marty G. D. « Anisakid larva in the viscera of a farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). » *Aquaculture* juillet 2008. Vol. 279, n°1-4, p. 209-210.

Mattiucci, Nascetti G., Bullini L. « Genetic structure of *Anisakis physeteris*, and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). » *Parasitology* octobre 1986. Vol. 93, n°02, p. 383-387.

Mattiucci, Paoletti M., Damiano S. « Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. » *Parassitologia*. 2007. Vol. 49, n°3, p. 147-153.

Mattiucci, Paoletti M., Webb S. C. « Genetic relationships among species of *Contracaecum Railliet & Henry*, 1912 and *Phocascaris Höst*, 1932 (Nematoda: Anisakidae) from pinnipeds inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and congruence with allozyme data. » *Parasite Paris Fr.* septembre 2008. Vol. 15, n°3, p. 408-419.

Mattiucci S., Abaunza P., Ramadori L. « Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. » *J. Fish Biol.* août 2004. Vol. 65, n°2, p. 495-510.

Mattiucci S., Cianchi R., Nascetti G. « Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. » *Syst. Parasitol.* 2003. Vol. 54, n°1, p. 13-23.

Mattiucci S., Cipriani P., Webb S. C., Paoletti M., Marcer F., Bellisario B., Gibson D. I., Nascetti G. « Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). » *J. Parasitol.* 2014. Vol. 100, n°2, p. 199-214.

Mattiucci S., Nascetti G. « Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. » *Adv. Parasitol.* 2008. Vol. 66, p. 47-148.

Mattiucci S., Nascetti G. « Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemispheres. » *EPG Genes Plenary Lect. Present. 21st Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol. 21st Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol.* août 2007. Vol. 148, n°1, p. 43-57.

Mattiucci S., Nascetti G. « Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. » *Parasite*. 2006. Vol. 13, n°2, p. 99-113.

Mattiucci S., Nascetti G., Cianchi R. « Genetic and Ecological Data on the *Anisakis simplex* Complex, with Evidence for a New Species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). » *J. Parasitol.* juin 1997. Vol. 83, n°3, p. 401.

Mattiucci S., Nascetti G., Clanchi R. « Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). » *J. Parasitol.* juin 1997. Vol. 83, n°3, p. 401-416.

Mattiucci S., Nascetti G., Dailey M. « Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). » *Syst. Parasitol.* juillet 2005. Vol. 61, n°3, p. 157-171.

Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G. « Allozyme and morphological identification of shape *Anisakis*, *Contraecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). » *Syst. Parasitol.* juin 1998. Vol. 40, n°2, p. 81-92.

Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G. « Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). » *Syst. Parasitol.* mars 2002. Vol. 51, n°3, p. 159-170.

Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G. « Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae)s. » *Int. J. Parasitol.* janvier 2001. Vol. 31, n°1, p. 9-14.

Mattiucci S., Paoletti M., Borrini F. « First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. » *BMC Infect. Dis.* 2011. Vol. 11, n°1, p. 82.

Mattiucci S., Paoletti M., Olivero-Verbel J., Baldiris R., Arroyo-Salgado B., Garbin L., Navone G., Nascetti G. « *Contraecum bioccai* n. sp. from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. » *Syst. Parasitol.* février 2008. Vol. 69, n°2, p. 101-121.

Mattiucci S., Paoletti M., Webb S. « *Anisakis nascettii* n. sp.(Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. » *Syst. Parasitol.* 2009. Vol. 74, n°3, p. 199-217.

Mazzucco W., Lacca G., Cusimano R., Provenzani A., Costa A., Di Noto A. M., Massenti M. F., Leto-Barone M. S., Lorenzo G. D., Vitale F. « Prevalence of sensitization to *Anisakis simplex* among professionally exposed populations in Sicily. » *Arch. Environ. Amp Occup. Health* 2012. Vol. 67, n°2, p. 91-97.

McCarthy J., Moore T. A. « Emerging helminth zoonoses. » *Int. J. Parasitol.* novembre 2000. Vol. 30, n°12-13, p. 1351-1359.

McClelland G., Marcogliese D. « Larval anisakine nematodes as biological indicators of cod (*Gadus morhua*) populations in the southern Gulf of St. Lawrence and on the Breton Shelf, Canada. » *Bull Scand Soc Parasitol.* 1994. Vol. 4, p. 97-116.

McClelland G., Misra R., Martell D. « Spatial and temporal distributions of larval sealworm (*Pseudoterranova decipiens*, Nematoda: Anisakinae), in *Hippoglossoides platessoides* (Pleuronectidae) in eastern Canada from 1980 to 1990. » *ICES J. Mar. Sci. J. Cons.* 2000. Vol. 57, n°1, p. 69-88.

McManus D. P., Knight M., Simpson A. J. « Isolation and characterisation of nucleic acids from the hydatid organisms, *Echinococcus* spp. (Cestoda). » *Mol. Biochem. Parasitol.* septembre 1985. Vol. 16, n°3, p. 251-266.

Measures L.N. « Anisakiosis and Pseudoterranovosis: U.S. Geological survey circular 1393. » 2014. 34p. ISSN 1067-084X

Mercado R., Torres P., Maira J. « Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). » *Rev. Saúde Pública.* 1997. Vol. 31, n°2, p. 178-181.

- Mesirov J. P. « Computer science. Accessible reproducible research. » *Sci. N. Y. NY*. 2010. Vol. 327, n°5964,.
- Metzker M. L. « Sequencing technologies — the next generation. » *Nat. Rev. Genet.* janvier 2010. Vol. 11, n°1, p. 31-46.
- Migaki G., Heckmann R. A., Albert T. F. « Gastric nodules caused by “*Anisakis* type” larvae in the bowhead whale (*Balaena mysticetus*) ». *J. Wildl. Dis.* 1982. Vol. 18, n°3, p. 353-357.
- Miliotis M. D., Bier J. W. « International handbook of foodborne pathogens. » [s.l.] : CRC Press, 2003. ISBN : 0-203-91206-3.
- Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie. « Arrêté du 29 janvier 2013 modifiant l'arrêté du 26 octobre 2012 déterminant la taille minimale ou le poids minimal de capture des poissons et autres organismes marins (pour une espèce donnée ou pour une zone géographique donnée) effectuée dans le cadre de la pêche maritime de loisir. » janvier 2013.
- Ministre de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, chargé des transports, de la mer et de la pêche. *NOR: TRAM1240353A*. juin 2015.
- Mitton J., Linhart Y., Sturgeon K., Hamrick J. « Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. » *J. Hered.* 1979. Vol. 70, n°2, p. 86-89.
- Möller H. « Nematode problems in North Atlantic Fish: report from a workshop in Kiel, 3-4 April 1989. » [s.l.] : ICES, 1989. 58 p.
- Moneo I., Caballero M. L., González-Muñoz M., Rodríguez-Mahillo A. I., Rodríguez-Perez R., Silva A. « Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. » *Parasitol. Res.* juillet 2005. Vol. 96, n°5, p. 285-289.
- Moravec F., Nagasawa K. « Some anisakid nematodes from marine fishes of Japan and the North Pacific Ocean. » *J. Nat. Hist.* 2000. Vol. 34, n°8, p. 1555-1574.
- Moravec F., Urawa S., Coria C. O. « *Hysterothylacium patagonense* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from freshwater fishes in Patagonia, Argentina, with a key to the species of *Hysterothylacium* in American freshwater fishes. » *Syst. Parasitol.* 1997. Vol. 36, n°1, p. 31-38.
- Morsy K., Bashtar A.-R., Abdel-Ghaffar F., Mehlhorn H., Quraishy S. Al, El-Mahdi M., Al-Ghamdi A., Mostafa N. « First record of anisakid juveniles (Nematoda) in the European seabass *Dicentrarchus labrax* (family: Moronidae), and their role as bio-indicators of heavy metal pollution. » *Parasitol. Res.* mars 2012. Vol. 110, n°3, p. 1131-1138.
- Morsy K., Bashtar A.-R., Mostafa N., Deeb S. El, Thabet S. « New host records of three juvenile nematodes in Egypt: *Anisakis* sp. (Type II), *Hysterothylacium patagonense* (Anisakidae), and *Echinocephalus overstreeti* (Gnathostomatidae) from the greater lizard fish *Saurida undosquamis* of the Red Sea. » *Parasitol. Res.* mars 2015. Vol. 114, n°3, p. 1119-1128.
- Mossali C., Palermo S., Capra E., Piccolo G., Botti S., Bandi C., D'Amelio S., Giuffra E. « Sensitive detection and quantification of anisakid parasite residues in food products. » *Foodborne Pathog. Dis.* 2010. Vol. 7, n°4, p. 391-397.

- Mo T. A., Gahr A., Hansen H., Hoel E., Oaland Ø., Poppe T. T. « Presence of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809 det. Krabbe, 1878) and *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda; Anisakidae) in runts of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. » *J. Fish Dis.* février 2014. Vol. 37, n°2, p. 135-140.
- Al-Moussawi A. A., Mohammad M. K. « *Contracaecum rudolphii* Hartwich, 1964 (Nematoda: Anisakidae) in the cormorant *Phalacrocorax carbo* (Linnaeus, 1758) wintering in Baghdad area: A new host record in Iraq. » *Bull Iraq Nat Hist Mus.* 2011. Vol. 11, n°3, p. 7-16.
- Mudry J., Lefebvre P., Dei-Cas E., Vernes A., Poirriez J., Débat M., Marti R., Binot P., Cortot A. « Anisakiase humaine: 5 cas dans le nord de la France. » *Gastroentérologie Clin. Biol.* 1986. Vol. 10, n°1, p. 83-87.
- Murata R., Suzuki J., Sadamasu K., Kai A. « Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. » *Parasitol. Int.* juin 2011. Vol. 60, n°2, p. 193-198.
- Myers B. « Anisakine nematodes in fresh commercial fish from waters along the Washington, Oregon and California Coasts [Food safety]. » *J. Food Prot.* 1979.
- Na H. K., Seo M., Chai J.-Y., Lee E. K., Jeon S. M. « A case of anisakidosis caused by *Pseudoterranova decipiens* larva. » *Korean J. Parasitol.* février 2013. Vol. 51, n°1, p. 115-117.
- Nadler S. A., D'Amelio S., Fagerholm H.-P., Berland B., Paggi L. « Phylogenetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Høst, 1932 (Nematoda : Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. » *Parasitology.* 2000. Vol. 121, n°04, p. 455-463.
- Nadler S., Rohde K. « Speciation and species delimitation. » *In: Marine Parasitology* K. Rohde Ed2005. p. 339-345.
- Nascetti G., Cianchi R., Mattiucci S., D'Amelio S., Orecchia P., Paggi L., Bratley J., Berland B., Smith J., Bullini L. « Three sibling species within *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-Boreal region: reproductive isolation and host preferences. » *Int. J. Parasitol.* 1993. Vol. 23, n°1, p. 105-120.
- Nieuwenhuizen N. E., Lopata A. L. « *Anisakis* – A food-borne parasite that triggers allergic host defences. » *Int. J. Parasitol.* novembre 2013. Vol. 43, n°12-13, p. 1047-1057.
- Nieuwenhuizen N., Lopata A. L., Jeebhay M. F., Broski R. H. De', Robins T. G., Brombacher F. « Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. » *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. Vol. 117, n°5, p. 1098-1105.
- Nikaido M., Matsuno F., Hamilton H., Brownell R. L., Cao Y., Ding W., Zuoyan Z., Shedlock A. M., Fordyce R. E., Hasegawa M. « Retroposon analysis of major cetacean lineages: the monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. » *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98, n°13, p. 7384-7389.
- Noboru K., Hiroshi I. « A case of abdominal syndrome caused by the presence of a large number of *Anisakis* larvae. » *Int. J. Parasitol.* avril 1992. Vol. 22, n°2, p. 251-253.

Norris D. E., Overstreet R. M. « *Thynnascaris reliquens* sp. n. and *T. habena* (Linton, 1900) (Nematoda: Ascaridoidea) from fishes in the northern Gulf of Mexico and eastern US Seaboard. » *J. Parasitol.* 1975. p. 330-336.

Novotny A. J., Uzmann J. R. « A statistical analysis of the distribution of a larval nematode (*Anisakis* sp.) in the musculature of chum salmon (*Oncorhynchus keta-walbaum*). » *Exp. Parasitol.* 1960. Vol. 10, n°2, p. 245-262.

Nuchjangreed C., Hamzah Z., Suntornthiticharoen P., Sorosjinda-Nunthawarasilp P. « Anisakids in marine fish from the coast of Chon Buri Province, Thailand. » *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2006. Vol. 37, p. 35.

Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Paggi L., Plötz J., Cianchi R., Nascetti G., Arduino P., Bullini L. « Two new members in the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda, Ascaridoidea) from the Antarctic. » *Int. J. Parasitol.* 1994. Vol. 24, n°3, p. 367-377.

Oshima T. « *Anisakiasis* — Is the sushi bar guilty? ». *Parasitol. Today* février 1987. Vol. 3, n°2, p. 44-48.

Paggi L., Mattiucci S., Gibson D. I., Berland B., Nascetti G., Cianchi R., Bullini L. « *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. » *Syst. Parasitol.* 2000. Vol. 45, n°3, p. 185-197.

Paggi L., Nascetti G., Cianchi R., Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Berland B., Bratney J., Smith J. W., Bullini L. « Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the north atlantic and norwegian and barents seas. » *Int. J. Parasitol.* avril 1991. Vol. 21, n°2, p. 195-212.

Paggi L., Nascetti G., Webb S. C., Mattiucci S., Cianchi R., Bullini L. « A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. » *Syst. Parasitol.* juillet 1998. Vol. 40, n°3, p. 161-174.

Pampiglione S., Rivasi F., Criscuolo M., De Benedittis A., Gentile A., Russo S., Testini M., Villani M. « Human Anisakiasis in Italy: A Report of Eleven New Cases. » *Pathol. - Res. Pract.* janvier 2002. Vol. 198, n°6, p. 429-434.

Park H.-K., Cho M. K., Park M. K., Kang S. A., Kim Y. S., Kim K. U., Lee M. K., Ock M. S., Cha H. J., Yu H. S. « A 24 kDa excretory-secretory protein of *Anisakis simplex* larvae could elicit allergic airway inflammation in mice. » *Korean J. Parasitol.* décembre 2011. Vol. 49, n°4, p. 373-380.

Pascual S., Antonio J., Cabo M. L., Piñeiro C. « *Anisakis* survival in refrigerated fish products under CO2 modified-atmosphere. » *Food Control* septembre 2010. Vol. 21, n°9, p. 1254-1256.

Pascual S., González A., Arias C., Guerra A. « Larval *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascaridoidea) of short-finned squid (Cephalopoda: Ommastrephidae) in north-west Spain. » *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 1999. Vol. 79, n°01, p. 65-72.

De Pécoulas P. E., Paugam A., Bourée P. « Anisakiose et allergie: une association morbide négligée? ». *Rev. Francoph. Lab.* 2014. Vol. 2014, n°464, p. 89-95.

Pekmezci G. Z. « Occurrence of *Anisakis simplex sensu stricto* in imported Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) represents a risk for Turkish consumers. » *Int. J. Food Microbiol.* juin 2014. Vol. 185C, p. 64-68.

Pekmezci G. Z., Onuk E. E., Bolukbas C. S., Yardimci B., Gurler A. T., Acici M., Umur S. « Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. » *Vet. Parasitol.* mars 2014. Vol. 201, n°1-2, p. 82-94.

Pellegrini M., Occhini R., Tordini G., Vindigni C., Russo S., Marzocca G. « Acute abdomen due to small bowel anisakiasis. » *Dig. Liver Dis.* janvier 2005. Vol. 37, n°1, p. 65-67.

Peñalver J., Dolores E. M., Muñoz P. « Absence of anisakid larvae in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in Southeast Spain. » *J. Food Prot.* 2010. Vol. 73, n°7, p. 1332-1334.

Peoples R. C. « A review of the helminth parasites using polychaetes as hosts. » *Parasitol. Res.* 2013. Vol. 112, n°10, p. 3409-3421.

Perdiguero-Alonso D., Montero F. E., Raga J. A., Kostadinova A. « Composition and structure of the parasite faunas of cod, *Gadus morhua* L.(Teleostei: Gadidae), in the North East Atlantic. » *Parasit. Vectors.* 2008. Vol. 1, n°1, p. 23.

Petric M., Mladineo I., Šifner S. K. « Insight into the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) feeding ecology: is there a link between helminth parasites and food composition? » *J. Parasitol.* 2011. Vol. 97, n°1, p. 55-62.

Petrie A., Wootten R., Bruno D., MacKenzie K., Bron J. A Survey of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in Scottish Fisheries and the Efficacy of Current Detection Methods: FSAS Project S14008. [s.l.] : Food Standards Agency, 2007.

Piccolo G., Manfredi M. T., Hoste L., Vercruyssen J. « Anisakidae larval infection in fish fillets sold in Belgium. » *Vet. Q.* 1999. Vol. 21, n°2, p. 66-67.

Podolska M., Horbowy J. « Infection of Baltic herring (*Clupea harengus*) with *Anisakis simplex* larvae, 1992-1999: a statistical analysis using generalized linear models. » *ICES J. Mar. Sci. J. Cons.* 2003. Vol. 60, n°1, p. 85-93.

Pompanon F., Deagle B. E., Symondson W. O. C., Brown D. S., Jarman S. N., Taberlet P. « Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. » *Mol. Ecol.* 2012. Vol. 21, n°8, p. 1931-1950.

Pond S. K., Wadhawan S., Chiaromonte F., Ananda G., Chung W.-Y., Taylor J., Nekrutenko A. « Windshield splatter analysis with the Galaxy metagenomic pipeline. » *Genome Res.* 2009. Vol. 19, n°11, p. 2144-2153.

Pontes T., D'Amelio S., Costa G., Paggi L. « Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. » *J. Parasitol.* 2005. Vol. 91, n°6, p. 1430-1434.

Porazinska D. L., Giblin-Davis R. M., Faller L., Farmerie W., Kanzaki N., Morris K., Powers T. O., Tucker A. E., Sung W., Thomas W. K. « Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. » *Mol. Ecol. Resour.* novembre 2009. Vol. 9, n°6, p. 1439-1450.

Del Pozo M., Audicana M., Diez J., Munoz D., Ansotegui I., Fernandez E., Garcia M., Etxenagusia M., Moneo I., Corres L. F. « *Anisakis simplex*, a relevant etiologic factor in acute urticaria. » *Allergy*. 1997. Vol. 52, n°5, p. 576-579.

Pravettoni V., Primavesi L., Piantanida M. « *Anisakis simplex*: current knowledge. » *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* août 2012. Vol. 44, n°4, p. 150-156.

Puente P., Anadón A. M., Rodero M., Romarís F., Ubeira F. M., Cuéllar C. « *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. » *Exp. Parasitol.* février 2008. Vol. 118, n°2, p. 271-274.

Pufall E. L., Jones-Bitton A., McEwen S. A., Brown T. M., Edge V. L., Rokicki J., Karpiej K., Peregrine A. S., Simard M. « Prevalence of zoonotic anisakid nematodes in inuit-harvested fish and mammals from the eastern Canadian arctic. » *Foodborne Pathog. Dis.* 2012. Vol. 9, n°11, p. 1002-1009.

Pulleiro-Potel L., Barcala E., Mayo-Hernández E., Muñoz P. « Survey of anisakids in commercial teleosts from the western Mediterranean Sea: Infection rates and possible effects of environmental and ecological factors. » *Food Control*. 2015.

Quail M. A., Smith M., Coupland P., Otto T. D., Harris S. R., Connor T. R., Bertoni A., Swerdlow H. P., Gu Y. « A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. » *BMC Genomics*. 2012. Vol. 13, n°1, p. 341.

Quince C., Lanzen A., Davenport R. J., Turnbaugh P. J. « Removing noise from pyrosequenced amplicons. » *BMC Bioinformatics*. 2011. Vol. 12, n°1, p. 38.

Ramanan P., Blumberg A. K., Mathison B., Pritt B. S. « Parametrial anisakidosis. » *J. Clin. Microbiol.* octobre 2013. Vol. 51, n°10, p. 3430-3434.

Rayé G., Miquel C., Coissac E., Redjadj C., Loison A., Taberlet P. « New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: chamois diet in autumn as a case study. » *Ecol. Res.* 2011. Vol. 26, n°2, p. 265-276.

Rello, Adroher F. J., Benítez R., Valero A. « The fishing area as a possible indicator of the infection by anisakids in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from southwestern Europe. » *Int. J. Food Microbiol.* février 2009. Vol. 129, n°3, p. 277-281.

Rello F., Adroher F., Valero A. « *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. » *Parasitol. Res.* décembre 2008. Vol. 104, n°1, p. 117-121.

Rello F., Valero A., Adroher F. « Anisakid parasites of the pouting (*Trisopterus luscus*) from the Cantabrian Sea coast, Bay of Biscay, Spain. » *J. Helminthol.* 2008. Vol. 82, n°04, p. 287-291.

Roepstorff A., Karl H., Bloemsma B., Huss H. H. « Catch handling and the possible migration of *Anisakis* larvae in herring, *Clupea harengus*. » *J. Food Prot.* 1993. Vol. 56, n°9, p. 783-787.

Rothberg J. M., Hinz W., Rearick T. M., Schultz J., Mileski W., Davey M., Leamon J. H., Johnson K., Milgrew M. J., Edwards M. « An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. » *Nature*. 2011. Vol. 475, n°7356, p. 348-352.

Sakanari J. A. « *Anisakis* — from the platter to the microfuge. » *Parasitol. Today* octobre 1990. Vol. 6, n°10, p. 323-327.

Sakanari J. A., McKerrow J. H. « Anisakiasis. » *Clin. Microbiol. Rev.* juillet 1989. Vol. 2, n°3, p. 278-284.

Sánchez-Monsalvez I., De Armas-Serra C., Martínez J., Dorado M., Rodríguez-Caabeiro F. « A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* larvae. » *J. Food Prot.* 2005. Vol. 68, n°5, p. 1066-1072.

Schadt E. E., Turner S., Kasarskis A. « A window into third-generation sequencing. » *Hum. Mol. Genet.* 2010. Vol. 19, n°R2, p. R227-R240.

Selander R. K., Caugant D. A., Ochman H., Musser J. M., Gilmour M. N., Whittam T. S. « Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. » *Appl. Environ. Microbiol.* mai 1986. Vol. 51, n°5, p. 873.

Serracca L., Cencetti E., Battistini R., Rossini I., Prearo M., Pavoletti E., Fioravanti M. L., Righetti M., Di Donfrancesco B., Ercolini C. « Survey on the presence of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in fishes and squids caught in Ligurian Sea. » *Vet. Parasitol.* septembre 2013. Vol. 196, n°3-4, p. 547-551.

Setyobudi E., Jeon C.-H., Lee C.-H., Seong K.-B., Kim J.-H. « Occurrence and identification of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) isolated from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. » *Parasitol. Res.* mars 2011. Vol. 108, n°3, p. 585-592.

Shamsi S., Eisenbarth A., Saptarshi S., Beveridge I., Gasser R., Lopata A. « Occurrence and abundance of anisakid nematode larvae in five species of fish from southern Australian waters. » *Parasitol. Res.* avril 2011. Vol. 108, n°4, p. 927-934.

Shamsi S., Poupa A., Justine J.-L. « Characterisation of Ascaridoid larvae from marine fish off New Caledonia, with description of new *Hysterothylacium* larval types XIII and XIV. » *Parasitol. Int.* octobre 2015. Vol. 64, n°5, p. 397-404

Shields B., Bird P., Liss W., Groves K., Olson R., Rossignol P. « The nematode *Anisakis simplex* in American shad (*Alosa sapidissima*) in two Oregon rivers. » *J. Parasitol.* 2002. Vol. 88, n°5, p. 1033-1035.

Sivertsen A. H., Heia K., Hindberg K., Godtliebsen F. « Automatic nematode detection in cod fillets (*Gadus morhua* L.) by hyperspectral imaging. » *J. Food Eng.* 2012. Vol. 111, n°4, p. 675-681.

Smith J. « *Phocascaris/Contracaecum* larvae (Nematoda) in fish. » [s.l.] : Conseil International pour l'Exploration de la Mer, 1984.

Smith J. W. « *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. » *J. Helminthol.* 1983. Vol. 57, n°03, p. 205-224.

Smith J., Wootten R. « *Anisakis* larvae (herringworm) (nematoda) in fish.» *Fiches D'identification Mal. Parasites Poissons Crustac. Mollusques.* 1984a. Vol. 8, p. 2-4.

Smith J., Wootten R. « *Pseudoterranova* larvae ('Codworm') (Nematoda) in fish » *Fiches D'identification Mal. Parasites Poissons Crustac. Mollusques.* 1984b. Vol. 7, p. 3-4.

- Smith J. W., Wootten R. « *Anisakis* and anisakiasis. » *Adv. Parasitol.* 1978. Vol. 16, p. 93-163.
- Smith J. W., Wootten R. « Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp. larvae (Nematoda : Ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. » *Int. J. Parasitol.* avril 1975. Vol. 5, n°2, p. 133-136.
- Sohn W.-M., Seol S. Y. « A human case of gastric anisakiasis by *Pseudoterranova decipiens* larva. » *Korean J Parasitol.* 1994. Vol. 32, n°1, p. 53-56.
- Solas M. T., García M. L., De las Heras C., Rodriguez-Mahillo A. I., Gonzalez-Munoz M., Moneo I., Mendizábal A., Tejada M. « *Anisakis Simplex* antigens in fresh and frozen-thawed muscle of anchovies in vinegar. » *Food Sci. Technol. Int.* avril 2009. Vol. 15, n°2, p. 139-148.
- Stoskopf M. K. « Fish medicine. » [s.l.] : WB Saunders Company, 1993. ISBN : 0-7216-2629-7.
- Strømnes E., Andersen K. « Distribution of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea) L3 larvae in three species of marine fish; saithe (*Pollachius virens* (L.)), cod (*Gadus morhua* L.) and redfish (*Sebastes marinus* (L.)) from Norwegian waters. » *Parasitol. Res.* 1998. Vol. 84, n°4, p. 281-285.
- Strøm S., Haarder S., Korbut R., Mejer H., Thamsborg S. M., Kania P. W., Buchmann K. « Third-stage nematode larvae of *Contraecum osculatum* from Baltic cod (*Gadus morhua*) elicit eosinophilic granulomatous reactions when penetrating the stomach mucosa of pigs. » *Parasitol. Res.* 2015. Vol. 114, n°3, p. 1217-1220.
- Sugimachi K., Inokuchi K., Ooiwa T., Fujino T., Ishii Y. « Acute gastric anisakiasis: analysis of 178 cases. » *Jama.* 1985. Vol. 253, n°7, p. 1012-1013.
- Suzuki J., Murata R., Hosaka M., Araki J. « Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. » *Int. J. Food Microbiol.* janvier 2010. Vol. 137, n°1, p. 88-93.
- Szostakowska B., Myjak P., Kur J. « Identification of anisakid nematodes from the Southern Baltic Sea using PCR-based methods. » *Mol. Cell. Probes* avril 2002. Vol. 16, n°2, p. 111-118.
- Szostakowska B., Myjak P., Wyszynski M., Pietkiewicz H., Rokicki J. « Prevalence of anisakin nematodes in fish from Southern Baltic Sea. » *Pol. J. Microbiol.* 2005. Vol. 54, p. 41.
- Tanaka J., Torisu M. « *Anisakis* and eosinophil I. Detection of a soluble factor selectively chemotactic for eosinophils in the extract from *Anisakis* larvae. » *J. Immunol.* 1978. Vol. 120, n°3, p. 745-749.
- Van Thiel P., Van Houten H. « The localization of the herringworm *Anisakis marina* in-and outside the human gastro-intestinal wall. » *Trop. Geogr. Med.* 1967. Vol. 19, n°1, p. 56-62.
- Tolonen A., Karlsbakk E. « The parasite fauna of the Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.). » *ICES J. Mar. Sci. J. Cons.* 2003. Vol. 60, n°1, p. 77-84.
- Torres P., Cubillos V. « Infección por larvas de *Contraecum* (Nematoda, Anisakidae) en salmónidos introducidos en Chile*. » *J. Vet. Med. Ser. B.* 1987. Vol. 34, n°1-10, p. 177-182.
- Tsang W. Y., Lemire B. D. « Mitochondrial genome content is regulated during nematode development. » *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. Vol. 291, n°1, p. 8-16.

Umehara A., Kawakami Y., Araki J., Uchida A. « Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. » *Parasitol. Int.* mars 2008. Vol. 57, n°1, p. 49-53.

Umehara A., Kawakami Y., Matsui T., Araki J., Uchida A. « Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. » *Parasitol. Int.* décembre 2006. Vol. 55, n°4, p. 267-271.

Umehara A., Kawakami Y., Ooi H.-K., Uchida A., Ohmae H., Sugiyama H. « Molecular identification of *Anisakis* type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. » *Int. J. Food Microbiol.* octobre 2010. Vol. 143, n°3, p. 161-165.

Urita Y., Nishino M., Koyama H., Kondo E., Naruki Y., Otsuka S. « Esophageal anisakiasis accompanied by reflux esophagitis. » *Intern. Med.* 1997. Vol. 36, n°12, p. 890-893.

Valentini A., Mattiucci S., Bondanelli P. « Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and comparison with allozyme data. » *J. Parasitol.* 2006. Vol. 92, n°1, p. 156-166.

Valentini A., Miquel C., Nawaz M. A., Bellemain E., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Cruaud C., Nascetti G., Wincker P. « New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. » *Mol. Ecol. Resour.* 2009. Vol. 9, n°1, p. 51-60.

Valero A., Martín-Sánchez J., Reyes-Muelas E., Adroher F. « Larval anisakids parasitizing the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of southern Spain. » *J. Helminthol.* 2000. Vol. 74, n°04, p. 361-364.

Vidaček S., De las Heras C., Solas M. T., Mendizábal A., Rodríguez-Mahillo A. I., González-Muñoz M., Tejada M. « *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae. » *J. Sci. Food Agric.* septembre 2009. Vol. 89, n°12, p. 1997-2002.

Whiteley A. S., Jenkins S., Waite I., Kresoje N., Payne H., Mullan B., Allcock R., O'Donnell A. « Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. » *J. Microbiol. Methods* octobre 2012. Vol. 91, n°1, p. 80-88.

Wootten R., Smith J. W. « Observational and experimental studies on the acquisition of *Anisakis* sp. larvae (Nematoda: Ascaridida) by trout in fresh water. » *Int. J. Parasitol.* juin 1975. Vol. 5, n°3, p. 373-378.

Wootten R., Yoon G., Bron J. « A survey of anisakid nematodes in Scottish wild Atlantic salmon. » *Food Stand. Agency Scotl. Proj.* 2010. p. S14008.

World Health Organization. *Code d'usages pour les poissons et les produits de la pêche CAC/RCP 52-2003.* 2003.

WoRMS Editorial Board (2015). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2015-12-16

Xu X., Sui J., Cao L., Lin H. « Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid screening of anisakid larvae in seafood. » *J. Sci. Food Agric.* 2010. Vol. 90, n°5, p. 877-881.

Yamaguti S., Arima S. « *Porrocaecum azarasi* n. sp.(Nematoda) from the Japanese seal. » *Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.* 1942. Vol. 17, p. 113-116.

Zhang L., Hu M., Shamsi S., Beveridge I., Li H., Xu Z., Li L., Cantacessi C., Gasser R. B. « The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA. » *Mol. Cell. Probes* octobre 2007. Vol. 21, n°5-6, p. 386-390.

Zhu X., D'Amelio S., Palm H., Paggi L., George-Nascimento M., Gasser R. « SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. » *Parasitology*. 2002. Vol. 124, n°06, p. 615-623.

Zhu X., Gasser R. B., Podolska M., Chilton N. B. « Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal dna sequences. » *Int. J. Parasitol.* décembre 1998. Vol. 28, n°12, p. 1911-1921.

Zhu X. Q., Podolska M., Liu J. S., Yu H. Q., Chen H. H., Lin Z. X., Luo C. B., Song H. Q., Lin R. Q. « Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. » *Parasitol. Res.* novembre 2007. Vol. 101, n°6, p. 1703-1707.

Annexes

Annexe 1 : Nom des poissons des dix-huit espèces impliquées dans le projet classés selon le nom de la famille
(Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie, 2013)

Image	Nom latin, nom commun et famille	Taille minimale de capture
	<i>Clupea harengus</i> (hareng) Famille : <i>Clupeidae</i>	Mer du Nord, Manche, océan Atlantique 20 cm
	<i>Sardina pilchardus</i> (sardine commune) Famille : <i>Clupeidae</i>	Mer du Nord, Manche, océan Atlantique 11 cm
	<i>Engraulis encrasicolus</i> (anchois) Famille : <i>Engraulidae</i>	Mer du Nord, Manche, océan Atlantique 12 cm Mer Méditerranée 9 cm
	<i>Gadus morhua</i> (cabillaud) Famille : <i>Gadidae</i>	Mer du Nord, Manche, océan Atlantique 42 cm
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i> (églefin) Famille : <i>Gadidae</i>	Mer du Nord, Manche, océan Atlantique 30 cm
	<i>Merlangius merlangus</i> (merlan) Famille : <i>Gadidae</i>	Mer du Nord, Manche, océan Atlantique 27 cm





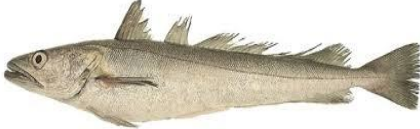







Image	Nom latin, nom commun et famille	Taille minimale de capture
	<p><i>Molva dypterygia</i> (lingue bleue) Famille : <i>Gadidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 70 cm</p>
	<p><i>Molva molva</i> (lingue franche) Famille : <i>Gadidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 63 cm</p>
	<p><i>Pollachius virens</i> (lieu noir) Famille : <i>Gadidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 30 cm</p>
	<p><i>Lophius piscatorius</i> (baudroie) Famille : <i>Lophiidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 50 cm</p>
	<p><i>Merluccius merluccius</i> (merlu) Famille : <i>Merluccidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 27 cm mer Méditerranée 20 cm</p>
	<p><i>Dicentrarchus labrax</i> (bar) Famille : <i>Moronidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 42 cm mer Méditerranée : 30 cm</p>

Image	Nom latin, nom commun et famille	Taille minimale de capture
	<p><i>Pleuronectes platessa</i> (plie) Famille : <i>Pleuronectidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 27 cm</p>
	<p><i>Salmo salar</i> (saumon Atlantique) Famille : <i>Salmonidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 50 cm</p>
	<p><i>Scomber japonicus</i> (maquereau espagnol) Famille : <i>Scombridae</i></p>	<p>mer du Nord : 30 cm Manche, océan Atlantique : 20 cm Méditerranée : 18 cm</p>
	<p><i>Scomber scombrus</i> (maquereau commun) Famille : <i>Scombridae</i></p>	<p>mer du Nord : 30 cm, Manche, océan Atlantique : 20 cm mer Méditerranée : 18 cm</p>
	<p><i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> (cardine franche) Famille : <i>Scophthalmidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique 20 cm</p>
	<p><i>Solea solea</i> (sole) Famille : <i>Soleidae</i></p>	<p>mer du Nord, Manche, océan Atlantique, mer Méditerranée : 24 cm</p>

Annexe 2 : Ensemble des espèces de poissons par zone de pêche non prévues du programme *Fish-Parasites*

Major area	Subarea	Division and subdivision	16 espèces de poisson hors plan	Total des espèces de poissons par zone de pêche
27_Northeast_Atlantic			<i>Lophius budegassa</i>	
			<i>Galeorhinus galeus</i>	
			<i>Scomber japonicus</i>	
			<i>Mola mola</i>	
			<i>Micromesistius poutassou</i>	x
			<i>Trachurus mediterraneus</i>	
			<i>Molva molva</i>	x
			<i>Trisopterus luscus</i>	
			<i>Sarda sarda</i>	
			<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	
			<i>Limanda limanda</i>	x
			<i>Pleuronectes platessa</i>	
			<i>Dicentrarchus punctatus</i>	x
			<i>Eutrigla gurnardus</i>	x
			<i>Belone belone</i>	x
			<i>Spondylisoma cantharus</i>	x
				6
	27_4	27.IV.b : mer du Nord centrale		1
	27_6	27.VI.a : côte nord-ouest de l'Écosse et Irlande du Nord ou Ouest Écosse		1
	27_7	VII.d : Manche Est		1
		27.VII.g : mer Celtique-nord		1
		27.VII.h : mer Celtique-sud		1
	27_8	27.VIII.a : golfe de Gascogne - nord		1
		27.VIII.b : golfe de Gascogne - central		7
		27.VIII.c : golfe de Gascogne - sud		1
37_Mediterranean and Black Sea	37_1	37_1_2-golfe de Lion		2
		Nombre d'individus échantillonnés par espèce		
			<i>Lophius budegassa</i>	4
			<i>Galeorhinus galeus</i>	1
			<i>Scomber japonicus</i>	31
			<i>Mola mola</i>	2
			<i>Micromesistius poutassou</i>	1
			<i>Trachurus mediterraneus</i>	1
			<i>Molva molva</i>	48
			<i>Trisopterus luscus</i>	5
			<i>Sarda sarda</i>	3
			<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	20
			<i>Limanda limanda</i>	1
			<i>Pleuronectes platessa</i>	32
			<i>Dicentrarchus punctatus</i>	1
			<i>Eutrigla gurnardus</i>	1
			<i>Belone belone</i>	2
			<i>Spondylisoma cantharus</i>	2

La croix (x) signifie que l'espèce de poisson a été échantillonnée dans cette zone de pêche

Annexe 3 : Page d'accueil de la base de données PARAFISH constituée dans le cadre du programme *Fish-Parasites*



Parafish explorer

Total records: 630 Ordering: Identifier

Ordering + reverse Records: 10 20 50 100

Fish identifier	Taxonomic rank	Dissection date	Size (cm)	Weight (g)	Sexual maturity	Sex
B0000001F0000001	Vitae curae	Jan 22, 2014	58	300	Unknown	Male
B0000001F0000002	Massa nulla lectus	Jan 26, 2014	84	2800	Yes	Unknown
B0000001F0000003	Metus ipsum amet elit	Mar 7, 2014	26	3900	Unknown	Unknown
B0000001F0000004	Fames netus semper	Feb 7, 2014	59	2600	Unknown	Unknown
B0000001F0000005	Neque magna	Jan 24, 2014	37	1200	Yes	Female
B0000001F0000006	Vitae felis bibendum	Apr 3, 2014	67	3400	Yes	Unknown
B0000001F0000007	Etiam lorem non	Apr 21, 2014	14	2100	Yes	Male
B0000001F0000008	Neque magna	Jul 4, 2014	73	500	Unknown	Unknown
B0000001F0000009	Magna netus orci	Mar 4, 2014	89	4500	Unknown	Unknown
B0000001F0000010	Fames netus semper	Jun 6, 2014	76	4200	Unknown	Female

< 1 2 3 4 5 >

TallorDev - Manager maupetit Documentation

Accueil > Core > Organs Ajouter Organ **D:DT**

Organs

1890 au total 1 2 3 4 ... 18 19

<input type="checkbox"/>	Organ Identifier	Legacy organ Identifier	Fish	Body part	Is load estimated?	Parasite load	Type of analysis	Identification technique	Lesion size	Lesion aspect
<input type="checkbox"/>	O0000630EY		B0000063F0000630	Eyes	✓	4000	Individual	Microscopy	★★★★	Tumor Growth
<input type="checkbox"/>	O0000630GI		B0000063F0000630	Gills	✗	900	NGS	Microscopy (Ziehl-Neelsen)	★★	Necrosis
<input type="checkbox"/>	O0000630BS		B0000063F0000630	Body Surface	✓	500	NGS	Histology	∅	Texture modification
<input type="checkbox"/>	O0000629EY		B0000063F0000629	Eyes	✓	200	Individual	Microscopy	★★★	Necrosis
<input type="checkbox"/>	O0000629GI		B0000063F0000629	Gills	✓	3400	NGS	Microscopy (Differential Interference Contrast)	★	--
<input type="checkbox"/>	O0000629BS		B0000063F0000629	Body Surface	✗	3500	Individual	Macroscopy	★★	--
<input type="checkbox"/>	O0000628EY		B0000063F0000628	Eyes	✗	1700	NGS	Histology (Periodic Acid Schiff)	★★★★★ ★	Texture modification
<input type="checkbox"/>	O0000628GI		B0000063F0000628	Gills	✓	800	NGS	Microscopy (GIEMSA)	★★★★	Texture modification
<input type="checkbox"/>	O0000628BS		B0000063F0000628	Body Surface	✓	1500	Individual	Microscopy	∅	Necrosis
<input type="checkbox"/>	O0000627EY		B0000063F0000627	Eyes	✗	4200	NGS	Microscopy (Differential Interference Contrast)	★	Color
<input type="checkbox"/>	O0000627GI		B0000063F0000627	Gills	✗	1200	Individual	Histology (Toluidine Blue Ortho)	★★	Tumor Growth
<input type="checkbox"/>	O0000627BS		B0000063F0000627	Body Surface	✓	4800	Individual	Molecular Biology (COX2)	★	Necrosis

0 sur 100 sélectionné

Annexe 4 : Premier article publié sur l'extraction d'ADN des Anisakidae

Monitoring of four DNA extraction methods upstream of high-throughput sequencing of Anisakidae nematodes

Seesao Y^{a,b}, Audebert C^{c,e}, Verrez-Bagnis V^d, Merlin S^{c,e}, Jérôme M^d, Viscogliosi E^b, Dei-Cas E^{b†}, Aliouat-Denis CM^{b,*}, Gay M^a.

^aANSES, Lab. Sécurité des Aliments, Dept Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulogne-sur-mer, France

^bBiologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents, Institut Pasteur de Lille (IPL), Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), UMR CNRS 8204, Inserm U1019, Univ. Lille Nord de France

^cGènes Diffusion, Douai, France

^dIfremer, Nantes, France

^ePEGASE-Biosciences, Institut Pasteur de Lille, France

Corresponding author

Cécile-Marie Aliouat-Denis

E-Mail: cecile.aliouat@univ-lille2.fr

BDEEP - Biology & Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens

CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, INSERM U 1019 - CNRS UMR 8204 IFR142, Institut Pasteur de Lille Université Lille Nord de France

1, rue du Professeur Calmette BP 245 59019 Lille cedex France

Tel +33 3 20 87 71 56/57

Keywords

Anisakidae; high-throughput sequencing; nematode; pooled DNA extraction; marine fish; COX2

Abstract

Different methods were evaluated to extract DNA from pooled nematodes belonging to Anisakis, Contracaecum, Pseudoterranova and Hysterothylacium genera isolated from edible fish. Pooled DNA extraction is the first and compulsory step to allow the identification of a large number of samples through high-throughput DNA sequencing with drastic time and cost reductions.

Text

In 2010, about 20,000 cases of Anisakidosis were reported worldwide. The human disease occurs accidentally after consumption of third-stage larvae of nematodes belonging to the Anisakidae family such as Anisakis simplex and some Pseudoterranova species in fish (EFSA, 2010; Mattiucci & Nascetti, 2008). The increase in reported cases is associated with changes in the consumption habits toward raw food, and a better diagnosis of the disease (Pravettoni et al., 2012). Nevertheless, knowledge of intermediate hosts, geographical distribution, taxonomy and the exact number of human cases of Anisakidosis is still incomplete.

The Fish-Parasites program (ANR-10-ALIA-004) has demonstrated that large numbers of Anisakidae nematodes were detected in fish organs in France (Seesao et al., 2014). Pooled DNA extraction combined with the recent technology of high-throughput sequencing (HTS) was chosen to identify nematodes at the species level by targeting the COX2 locus. Compared with traditional methods dealing with one sample at a time, HTS offers the advantage to be less time consuming and to reduce costs (Porazinska et al., 2009).

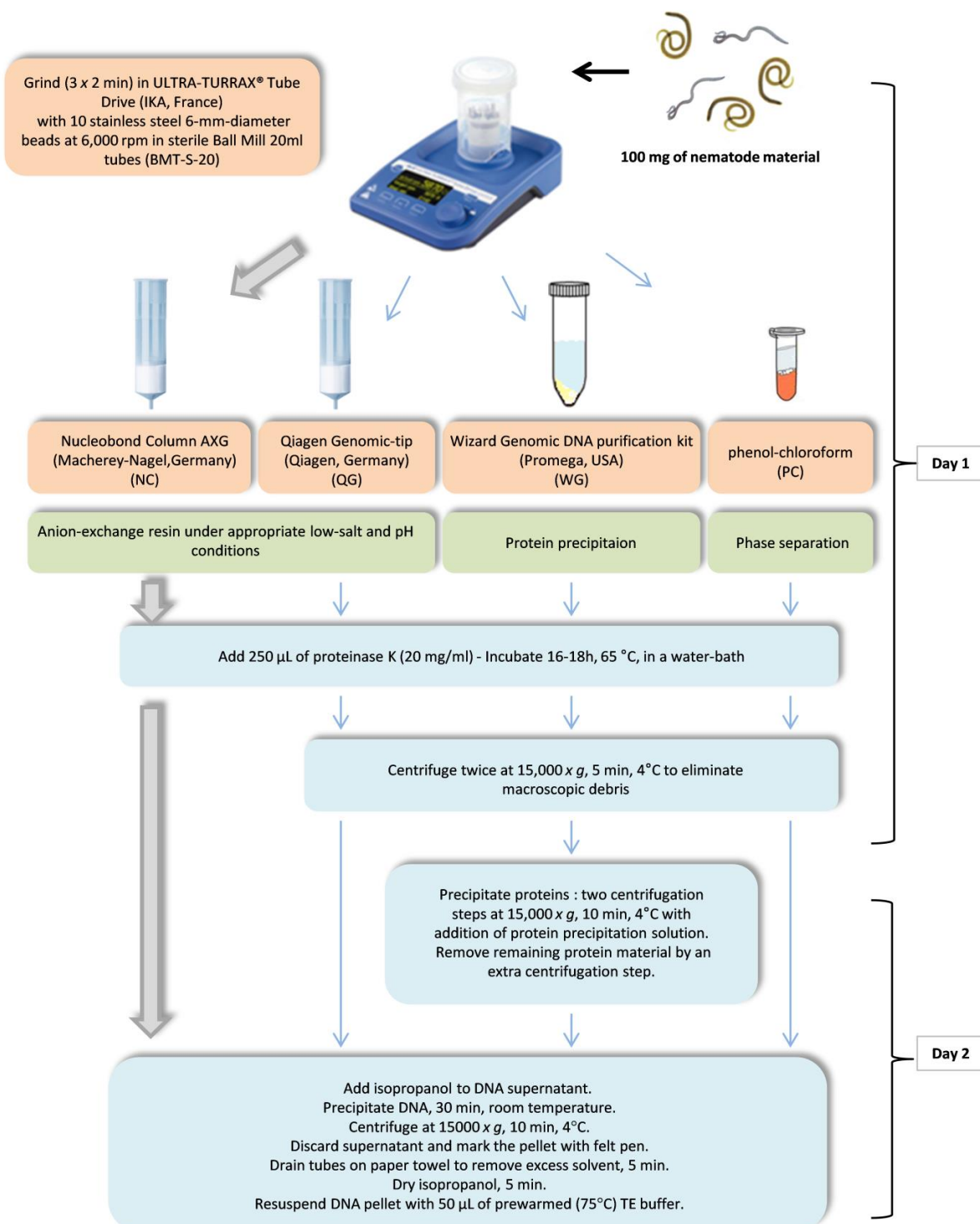
The yield and quality of genomic DNA (gDNA) extraction are crucial issues to be solved prior to HTS. Extraction of nematodes gDNA is not straightforward (Lawton et al., 1998) because of their robust cuticle layer (460 nm-thick) which is resistant to chemical, enzymatic and mild physical disruptions (Dawkins & Spencer, 1989, McManus et al., 1985).

The aim was to develop a method to efficiently and evenly purify gDNA from *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova* and *Hysterothylacium* nematodes. Several DNA extraction methods were adapted to large quantities of starting material and the quality and yield of DNA extractions were monitored (Figure 1).

Nematodes were isolated from several fish species bought from fish retailers in Boulogne-sur-Mer (France). The nematodes belonging to the genera *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova* and *Hysterothylacium* genera were morphologically identified according to Huang (1988) and separated. The worms were artificially mixed in a weight proportion resembling real conditions observed in formerly sampled fish: 75% of *Anisakis* (about 43-47 worms), 3% of *Contracaecum* (about one worm), 2% of *Pseudoterranova* (about one worm) and 20% of *Hysterothylacium* (about one worm), the number of worms depending on their respective size. Hundred milligrams of the mixed nematode material was used to assay gDNA extraction performance of four selected methods: Wizard Genomic (WG) DNA purification kit (Promega, USA), Nucleobond Column (NC) AXG kit (Macherey-Nagel, Germany), Qiagen Genomic-tip (QG) kit (Qiagen, Germany) and Phenol-Chloroform (PC) standard method. The essential steps of the four nematode gDNA extraction protocols are displayed in Figure 1. The grinding step using the ULTRA-TURRAX® Tube Drive workstation (IKA, France) was common to all protocols. It was chosen for its efficiency, speed, easiness to handle and its disposable and hermetic tubes that avoid cross-sample contaminations.

The gDNA quality and quantity were respectively measured using the NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, France) and the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit on a fluorescence microplate reader (Tecan GENios, Tecan Genios, Switzerland). To detect the presence of inhibitors, a quantitative PCR (qPCR) (RotorGene, Corbett Life Science, Australia) targeting a fragment of the Anisakidae COX2 gene was performed using specific primers (F-univ-nem 5'-GGT GTT

CTT TCT TTT GTT TCT G-3' and R-univ-nem 5'-ATA AAA CTA TGG TTA GCC CCA C-3'). This primer pair is commonly used in our laboratory and evenly amplifies a 530-pb fragment of the COX2 gene from the four parasite genera. The PCR thermocycling program was as follows: primary denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 20 sec, 45°C for 15 sec and 72°C for 45 sec. Quantitative PCR was performed with Brilliant II SYBR® Green qPCR Mastermix (Stratagene, USA) with the following mix formulation for a final volume of 15 µL: Brilliant II 2X Mix, F-univ-nem and R-univ-nem primers 400 nM, DNA sample 2 µL. To proceed with melting curves, temperature ramping was set from 47°C to 95°C, rising by 1 °C every 5 sec.



The NC and WG kits gave the best results compared to the other techniques. The purity of gDNA was good with OD_{260/280} ratios close to or above 1.80 for all kits (Table 1). For the NC kit, the OD_{260/230} ratio was the highest (1.80) compared to the other kits and attested of the removal of most of solvent contaminations. Ct values demonstrated less inhibitors using the NC and WG kits in comparison to the QG and PC kits. Moreover, both NC and WG kits gave better results when extracting *Contraecaecum* DNA, which is harder to extract with good yield due to its small size and

probably complex cuticle structure. Genomic DNA of the same sample mix, containing the four Anisakid genera, was extracted ten times with both NC and WG adapted methods to evaluate their repeatability (Table 2).

Individual DNA quantity values fell in a narrower range for NC (91.45 ng/ μ L – 109.34 ng/ μ L) than for WG (46.25 ng/ μ L – 104.93 ng/ μ L) kits. The lower standard deviation (SD) of the corresponding averaged values for the NC kit (SD = 6.41 ng/ μ L) also strengthens the steadier yields of the gDNA extracted by the NC kit compared to the WG (SD = 17.89 ng/ μ L) kit (Table 2). The averaged yield of extracted DNA was also significantly higher with the NC (101.52 ng/ μ L) than with the WG (76.68 ng/ μ L) kit (Table 2). For WG, one sample has been discarded because the DNA quantity was less than 2 fold the standard deviation.

In terms of quality, both OD260nm/280nm and OD260nm/230nm ratios were significantly better for NC than for WG. Both kits were efficient at purifying gDNA from proteins but NC was better at removing any remaining solvent traces thanks to the anion-exchange resin (Tables 1 and 2). Quantitative PCR was conducted on a pool of the 9 or 10 repeats for each kit. Ct of NC showed slightly less inhibitors than WG (Table 2).

In our study, the HTS downstream application required as good quality and quantity of nematode gDNA as possible. In addition, the complex structure of the nematode cuticle rendered the gDNA purification difficult. This is why some modifications to the classical tissue protocols such as the grinding step, the addition of proteinase K for efficient tissue lysis, longer incubation time and elution with pre-warmed TE were implemented (Figure 1). The Nucleobond Column AXG (Macherey-Nagel, Germany) was selected amongst the four tested gDNA purification methods because it allowed the best purification of nematode gDNA with the best and most repeatable yield at a lower cost (thick arrow, Figure 1).

Authors would like to thank all the Fish-Parasites members, the staff from ANSES, Boulogne-sur-Mer, France; Gènes Diffusion, Douai, France and PEGASE-Biosciences, Institut Pasteur de Lille, France; IPL-CIIL-BDPEE, Lille, France; IUP-QPAH, Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), Boulogne-sur-mer, France. This work is funded by a thesis scholarship from the Ministry of Science and Technology of Thailand and the ANR-10-ALIA-004 Fish-Parasites program. Supplementary data can be requested from ANSES, Boulogne-sur-Mer and BDEEP laboratory, Institut Pasteur de Lille.

Legend of figure

Figure 1. Comparison of different nematode gDNA extraction protocols. Four kits based on 3 different principles were assayed. Some steps were modified to be adapted to nematode DNA extraction and are depicted on the figure: longer proteinase K incubation time (step 2), 250 μ L of

proteinase K (20 mg/mL) added to 100 mg ground nematodes (step 2), repeated lysate centrifugation before extraction (step 3*), two protein precipitation steps (step 4*), drying of DNA pellet and suspension in prewarmed TE buffer (last step). The Nucleobond column AXG kit was selected to be used in downstream HTS application in the frame of the Fish-Parasites program (thick arrow).

References

Dawkins, H.J.S., Spencer, T.L., 1989. The isolation of nucleic acid from nematodes requires an understanding of the parasite and its cuticular structure. *Parasitology Today*, (5)3, 73-6.

European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8(4),1543 (91 p).

Huang, W., 1988. Anisakidés et anisakidoses humaines. Deuxième partie: Enquête sur les Anisakidés de poissons commerciaux du marché parisien. *Annales de Parasitologie Humaine Comparée*, 63, 197-208.

Lawton, J.H., Bringell, D.E., Bolton, B., 1998. Biodiversity inventories, indicator taxa and effects of habitat modification in tropical forest. *Nature*, 391, 72-76, DOI: 10.1038/34166.

Mattiucci, S., Nascetti, G., 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, 66, 47-148, DOI: 10.1016/S0065-308X (08)00202-9.

McManus, D.P., Knight, M., Simpson, A.J.G., 1985. Isolation and characterisation of nucleic acids from the Hydatid organisms, *Echinococcus* spp.(Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16, 251-266.

Porazinska, D.L., Giblin, L.M., Faller, L., 2009. Technical advances: Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1439-1450, DOI:10.1111/j.1755-0998.2009.02611.x.

Pravettoni, V., Primavesi, L., Piantanida, M., 2012. *Anisakis simplex*: current knowledge. *European Annals Allergy Clinical Immunology*, 4, 150-156.

Seesao, Y., Gay, M., Dei-Cas, E., Audebert, C., Thébault, A., Verrez-Bagnis, V., Le Fur, B., Delplace, L., Viscogliosi, E., Dupouy-Camet, J., Merlin, S., Blervaque, R., Bourgau, O., Jérôme, M., Aliouat-Denis, C.M., 2014. Characterization of Anisakidae nematodes by high-throughput sequencing and their prevalence in fish. In preparation.

Annexe 5 : Valorisation du travail

Articles scientifiques:

Seesao Y, Audebert C, Verrez-Bagnis V, Merlin S, Jérôme M, Viscogliosi E, Dei-Cas E†, Aliouat-Denis CM, Gay M. *Monitoring of four DNA extraction methods upstream of high-throughput sequencing of Anisakidae nematodes*. 2014. Journal of Microbiological Methods. Volume 102, Juillet 2014, Pages 69–72. doi : 10.1016/j.mimet.2014.05.004.

Seesao Y, Loywick A, Merlin S, Even G, Blervaque R, Viscogliosi E, Gay M , Aliouat-Denis CM, Audebert C. *Set up of high-throughput sequencing of anisakid nematodes isolated from fish*. International Journal for Parasitology. Article en préparation.

Seesao Y, Verrez-Bagnis V, Thébault A, Gay M, Bourgau O, Merlin S, Blervaque R, Cuzzucoli D, Jérôme M, Dei-Cas E, Viscogliosi E, Audebert C, Aliouat-Denis CM. *Prevalence of Anisakidae nematodes in fish fillets and organs as monitored by high-throughput and Sanger sequencing at the COX2 locus*. Molecular Ecology . Article en préparation.

Seesao Y, Audebert C, Gay M, Viscogliosi E, Aliouat-Denis CM . *A review of methods for nematode identification*. Journal of Microbiological Methods. Article en préparation.

Seesao Y, Gay M, Certard G, Gantois N, Bourgau O, Nenanrouz S, Aliouat-Denis CM, Viscogliosi E. *Prevalence of Blastocystis spp. and Cryptosporidium spp. in fish digestive tract*. Molecular Ecology. Article en préparation.

Communications orales :

Gay M., Verrez-Bagnis V., Thebault A., Seesao Y., Le Fur B., Cuzzucoli D., Cos I., Jérôme M., Certad G., Audebert C., Dupouy-Camet J., Viscogliosi E., Dei-Cas E., Aliouat-Denis C.-M. Prevalence & identification of Anisakidae in fishery products: the Fish-Parasites action. The 9th International Symposium on Fish Parasites (Valence, Espagne) (31 août 2015 au 04 septembre 2015)

Seesao Y., Audebert C., Gay M., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Merlin S., Bourgau O., Marc J., Cos I., Cuzzucoli D., Le Fur B., Dupouy-Camet J., Dei-Cas E., Viscogliosi E. & Aliouat-Denis C.-M. Development of a high-throughput sequencing method to identify Anisakidae species in fish. Third International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface (ICOPHA1): One Health for Sustainable Development (Chiang Mai, Thaïlande) (5-8 août 2015)

Seesao Y., Verrez-Bagnis V., Thebault A., Gay M., Le Fur B., Cuzzucoli D., Cos I., Marc J., Certad G., Audebert C., Dupouy-Camet J., Viscogliosi E., Dei-Cas E., & Aliouat-Denis C.-M. Prévalence et identification d'Anisakidae dans les produits de la mer: l'action Fish-Parasites. Congrès 2015 de la Société Française de Parasitologie et Mycologie Médicale (Bordeaux, France) (21-22 mai 2015)

Gay M., Verrez-Bagnis V., Thebault A., Seesao Y., Le Fur B., Cuzzucoli D., Cos I., Jérôme M., Certad G., Audebert C., Dupouy-Camet J., Viscogliosi E., Dei-Cas E., Aliouat-Denis C.-M. Prévalence et identification d'Anisakidae dans les produits de la mer : l'action Fish-Parasites. Colloque Qualité et Sécurité des Produits Aquatiques (Boulogne sur mer, France) (17-19 juin 2014)

Seesao Y., Gay M., Dei-Cas E., Audebert C., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Le Fur B., Dupouy-Camet J. & Aliouat-Denis C.-M. Approches de séquençage à haut débit pour l'étude des parasites de poissons. Journées scientifiques de l'Institut Pasteur de Lille sur les parasites de poisson (Lille, France) (26 Mai 2014)

Seesao Y., Gay M., Dei-Cas E., Audebert C., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Le Fur B., Viscogliosi E., Dupouy-Camet J. & Aliouat-Denis C.-M. Caractérisation des parasites dans les produits de la pêche : développement de méthodes d'identification et prévalence. Congrès 2014 de la Société Française de Parasitologie et Mycologie Médicale (Reims, France) (21-22 mai 2014)

Seesao Y., Gay M., Dei-Cas E., Audebert C., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Le Fur B., Dupouy-Camet J. & Aliouat-Denis C.-M. Caractérisation des Anisakidae dans les produits de la pêche : développement de méthodes d'identification et prévalence. Journées des doctorants et post doctorants de l'Anses (Maisons-Alfort, France) (27-28 février 2014)

Seesao Y., Gay M., Dei-Cas E., Audebert C., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Le Fur B., Dupouy-Camet J. & Aliouat-Denis C.-M. Caractérisation des parasites dans les produits de la pêche : prévalence et développement de méthodes d'identification. Journées des doctorants et post doctorants de l'Anses (Maisons-Alfort, France) (27-28 novembre 2013)

Seesao Y., Gay M., Dei-Cas E., Audebert C., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Le Fur B., Dupouy-Camet J. & Aliouat-Denis C.-M. Characterization of parasites in fishery products: Prevalence and development of identification method. 1ère Doctoriales de la mer (Boulogne sur Mer, France) (10 octobre 2013)

Posters Scientifiques :

Seesao Y., Gay M., Dei-Cas E., Audebert C., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Le Fur B., Dupouy-Camet J. & Aliouat-Denis C.-M. Characterization of parasites in fishery products: prevalence and development of identification method. International Conference Food Micro (Nantes, France) (01 au 04 septembre 2014)

Seesao Y., Audebert C., Gay M., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Merlin S., Bourgau O., Marc J., Cos I., Cuzzucoli D., Le Fur B., Dupouy-Camet J., Dei-Cas E., & Aliouat-Denis C.-M. Development of a high-throughput sequencing method to identify Anisakidae species in fish. Congrès ICOPA (International congress of parasitology (Mexique) (10 au 15 août 2014)

Seesao Y., Gay M., Dei-Cas E., Audebert C., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Le Fur B., Dupouy-Camet J. & Aliouat-Denis C.-M. Caractérisation des parasites dans les produits de la pêche : prévalence et développement de méthodes d'identification. Les premières journées Franco-Maghrébines de parasitologie et mycologie médicale (Rabat, Maroc) (23 au 26 octobre 2013)

Quelques exemples des abstracts, poster et première page des présentations orales acceptés par différents congrès sont présentés dans les pages suivantes :

Abstract accepté et poster du congrès ICOPA, Mexique, 2014

Development of a high-throughput sequencing method to identify Anisakidae species in fish

Seesao, Yuwalee¹⁻²; Audebert, Christophe³⁻⁴; Gay, Mélanie¹; Thébault, Anne⁵; Verrez-Bagnis, Véronique⁶; Sophie, Merlin³⁻⁴; Odile Bourgau¹; Marc, Jérôme⁶; Isabelle, Cos⁷; Cuzzucoli Diane⁵; Le Fur, Bruno⁷; Viscogliosi, Eric²; Dupouy-Camet, Jean⁸; Dei-Cas, Eduardo²; Aliouat-Denis, Cécile-Marie².

¹ANSES-Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Boulogne-sur-Mer, France, Yuwalee.SEESAO@anses.fr; ²IPL-CIIL-BDPEE, Univ Lille Nord de France, France; ³Gènes Diffusion, Douai, France; ⁴PEGASE-Biosciences, Institut Pasteur de Lille, France; ⁵ANSES-DER-UMAMSA, Maisons-Alfort, France; ⁶IFREMER-BRM-EM³B, Nantes, France; ⁷Innovation platform Nouvelles Vagues, Boulogne-sur-Mer, France; ⁸Cochin Hospital, Paris Descartes University Paris, France;

BACKGROUND: To better define the impact of fish parasites of the Anisakidae family on consumers' health as well as to improve the safety of fish products, we set up the French national Fish-Parasites network (ANR-10-ALIA-004) to sample fish, collect Anisakid nematodes and analyze prevalence data.

METHODS: A total of 290 fish (11 species) were sampled (Channel, North sea, Mediterranean sea, Bay of Biscay and Ireland sea). Nematodes were collected from corporal cavity, liver and fish fillets and gDNA was extracted in pool. A consensus primer pair was designed to target the *COX2* gene of *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova* and *Hysterothylacium* genera. Parasites were identified using high-throughput sequencing (PGM Ion Torrent, Life Technologies). An automated analysis workflow (Galaxy) compared the *COX2* sequences with those of a reference database.

RESULTS: High-throughput sequencing allowed the identification of 45 942 nematodes. Six runs were necessary to get all the *COX2* sequences. The automated sequence identification placed the *Anisakis* genus as the most prevalent (99%). The species *A. simplex* represented 95%. Other *Anisakis* species (*A. pegreffii*, *A. paggiae*, etc.) added up to 2.7% and 1.3% corresponded to undefined species. The other genera were also identified (below 1%).

CONCLUSION: A high-throughput sequencing technology was successfully applied to quickly and reliably establish the Anisakid species proportion in fish.

Keywords: *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium*, high-throughput sequencing, *COX2*, pooled DNA extraction, fish

A2218



<http://fish-parasites.com>
Yuwalee.seesao@anses.fr

Prevalence of anisakid parasites in fishery products: development of identification methods

Yuwalee SEESAO,

Mélanie GAY, Christophe AUDEBERT, Anne THEBAULT, Véronique VERREZ-BAGNIS, Bruno LE FUR, Eduardo DEI-CAS, Eric VISCOGLIOSI, Cécile-Marie ALIOUAT-DENIS, Jean DUPOUY-CAMET and the members of the 'Fish-Parasites' network



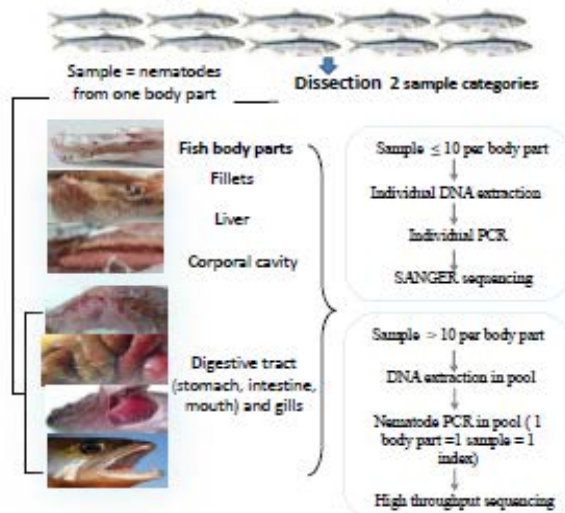
Protozoan and metazoan parasites frequently infest fish worldwide. Some of them are both fish pathogens and recognized agents of important zoonoses with high public health impact. Anisakid nematodes such as *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Contracaecum* are responsible of Anisakidosis/Anisakiosis. *Hysterothylacium* is also included in this study although its pathogenicity to human has not been reported so far.

The Fish-Parasites project funded by ANR-ALIA aims *in fine* at improving the safety of fish and fish-derived products through a multidisciplinary work program.

Methods

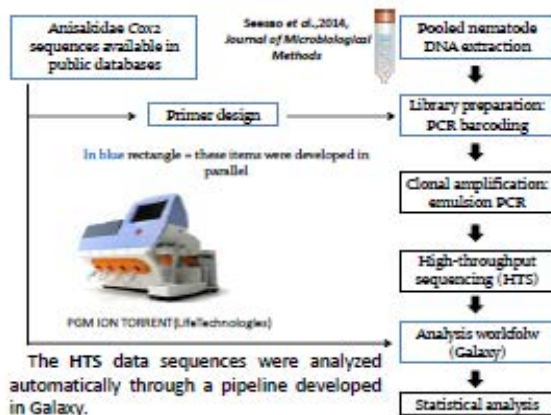
Processing of fish samples

1 batch of fish (fish species, fishing area, season, weight, size, sex and sexual maturation)



1,675 fish from 15 species were sampled from the North-East Atlantic ocean. The fish organs were processed in priority according to their frequency of consumption.

How to perform High Throughput Sequencing (HTS) to identify nematodes ?



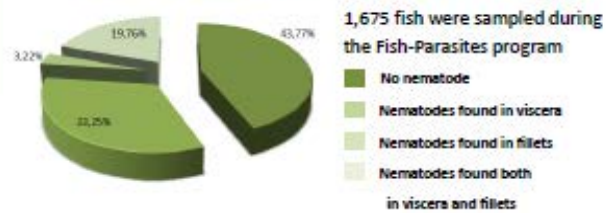
Acknowledgements: this project is financially supported by the ANR (Reference ANR-10-ALIA-004). It was labeled by Pôle de compétitivité of 'Région Nord-Pas de Calais': "Aquimer, le pôle des produits aquatiques".

Conclusions

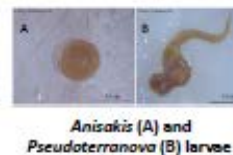
- The molecular identification of Anisakid nematodes by high throughput sequencing allows to reduce time and cost.
- These data will be statistically analyzed to determine the potential structuring role of some factors on Anisakid distribution in fish.
- The data on Anisakid species distribution in fish consumed in France will be updated thanks to the Fish-Parasites program.

First results

The prevalence of nematodes in fish body parts



Global proportion of Anisakidae species identified in fish by HTS



1 % *P. krabbei*

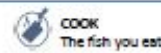
3 % other Anisakidae species

96 % *A. simplex*

54 383 nematodes from 438 body parts of 290

fish of 15 species (102 filets, 128 livers and 208 corporal cavities) have been identified in 6 runs of HTS. All fish body parts contained at least one *Anisakis simplex* nematode. There are also unknown *Contracaecum* and *Anisakis* sequences which may be new types of Anisakidae.

PREVENTION AGAINST FISH PARASITES IT IS EASY IF YOU FOLLOW A FEW ADVICES!



COOK
The fish you eat



FREEZE
The fish at -20°C during 7 days in all parts of the product especially if you eat it raw



CLEAN / EVISCERATE
The fish before eating or freezing it



PREFER
The fish fillet rather than the viscera (liver, soft roe, eggs, etc.).



Abstract accepté et Présentation du congrès ICOPHAI, Thaïlande, 2015
Development of a high-throughput sequencing method to identify Anisakidae species in fish

Seesao, Yuwalee¹⁻²; Audebert Christophe³⁻⁴; Gay Mélanie¹; Thébault Anne⁵; Verrez-Bagnis Véronique⁶; Merlin Sophie³⁻⁴; Bourgau Odile¹; Marc Jérôme⁶; Cos Isabelle⁷; Cuzzucoli Diane⁵; Le Fur Bruno⁷; Dupouy-Camet Jean⁸; Dei-Cas Eduardo²; Viscogliosi Eric²; Aliouat-Denis Cécile-Marie².

¹ANSES-Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Boulogne-sur-Mer, France, Yuwalee.SEESAO@anses.fr; ²IPL-CIIL-BDPEE, Univ Lille Nord de France, France; ³Gènes Diffusion, Douai, France; ⁴PEGASE-Biosciences, Institut Pasteur de Lille, France; ⁵ANSES-DER-UMA-MSA, Maisons-Alfort, France; ⁶IFREMER-BRM-EM, Nantes, France; ⁷Innovation Platform Nouvelles Vagues, Boulogne-sur-Mer, France; ⁸Cochin Hospital, Paris Descartes University Paris, France;


OBJECTIVES: Protozoan and metazoan parasites frequently infest edible fish worldwide. Among them, nematode larvae belonging to the Anisakidae family (*Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* genera) occur in numerous fish and cephalopod species. If ingested raw or lightly cooked, these larvae may induce digestive or allergic symptoms in human. In France, the consumption of cooked and raw fish products is increasing. To better define the impact of fish parasites on consumers' health as well as to improve the safety of fish products, we set up the Fish-Parasites network (ANR-10-ALIA-004). One axis of this program was to identify Anisakidae nematodes sampled from fish and to collect and analyze prevalence data.

METHODS: A total of 1 781 fishes belonging to 15 species were sampled from the North-Est Atlantic Ocean (Channel, North Sea, bay of Biscay, Ireland sea, Iceland and Faroes Grounds) and Mediterranean Sea. The targeted fish species were selected based on a sampling scheme which was established following a risk ranking analysis. Data on fish biometry, environment, level of parasite infestation and parasite localization in fish organs were gathered into the PARAFISH database. A standardized dissection protocol was applied by all partners to collect, store and identify the parasites. Genomic DNA (gDNA) was extracted from each nematode parasite individually if the fish organ contained less than 11 nematodes. Pooled gDNA extraction was performed if 11 nematodes or more were present per organ. The Anisakidae parasites were identified using *COX2* gene direct sequencing (less than 11 nematodes) or high-throughput sequencing (HTS, PGM Ion Torrent, Life Technologies) for 11 nematodes or more. 45 942 nematodes isolated from 438 organs (filet, liver and corporal cavity) from 290 fish (11 species) were identified by HTS. An automated workflow of analysis implemented into the Galaxy interface (<https://usegalaxy.org/>) compared the *COX2* sequences with those of a reference database and allowed to identify the nematodes at the species level.

RESULTS: The nematodes were absent in 44 % of the fish. They were present in the viscera (33 %), in both the viscera and in the fillets (23 %) or only in the fillets (3 %) of the sampled fish. The automated sequence identification nematodes placed the *Anisakis* genus as the most prevalent (99 %). Among this genus, *A. simplex* represented 95 %. The following species: *A. pegreffii*, *A. paggiae*, *A. brevispiculata*, *A. physeteris*, *A. typica* and *A. ziphidarum* added up to 3 %. *Pseudoterranova* spp., *Contracaecum* spp., *Hysterothylacium* spp. and *Phocascaris* spp. were also identified but in small proportion (below 1 %). Eventually, unidentified samples represented 1%. These unidentified sequences could be from new nematode subtypes or species.

CONCLUSIONS: A high-throughput sequencing technology was successfully applied to quickly and reliably monitor the proportion of Anisakidae species in fish. Our results will be statistically analyzed according to biometric and environmental factors in order to determine their potentially structuring role on distribution of Anisakidae species in fish. Finally, this analysis will enable the definition of better-suited preventive measures for the consumer.


Keywords: *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium*, high-throughput sequencing, COX2, pooled DNA extraction, fish










Third International congress on Pathogens at the Human-Animal Interface : one health for sustainable Development

Development of a high-throughput sequencing method to identify Anisakid species in fish

Seesao Y., Audebert C., Gay M., Thebault A., Verrez-Bagnis V., Merlin S., Loywick A., Bourgau O., Marc J., Cos I., Cuzzucoli D., Le Fur B., Dupouy-Camet J., Dei-Cas E., Viscogliosi E. & Aliouat-Denis C-M.



August 7th 2015, Chiang Mai, Thailand

1

Annexe 6 : Prévalence des 210 espèces de poissons issus de 100 articles publiés

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infecté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Ammodytidae</i>	<i>Ammodytes tobianus</i>	Lesser seneel	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	61	Abollo et al., 2001
	<i>Hyperoplus lanceolatus</i>	Greater sandeel	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001
<i>Anarhichadidae</i>	<i>Anarhichas lupus</i>	Loup de l'Atlantique	Belgique	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	6,6	181	Piccolo et al., 1999
<i>Anoploomatidae</i>	<i>Anoplopoma fimbria</i>	Charbonnier	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	100	4	Myers, 1979
<i>Aulopidae</i>	<i>Aulopus filamentosus</i>	Limbert	Italie	Mer de Ligurie	Non infecté par Anisakinae	-	0	1	Serracca et al., 2013
<i>Ballistidae</i>	<i>Abalistes stellaris</i>	-	Yemen	Mer rouge	Anisakinae+Rhaphidascariidae	As, H. sp.	10,7	28	Al-Zubaidy, et al., 2012
<i>Belontiidae</i>	<i>Belone belone</i>	Orphie	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap	100	25	Abollo et al., 2001
<i>Bothidae</i>	<i>Arnoglossus imperialis</i>	Arnoglosse impérial	Portugal	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap, At, Hb As-Ap	12,2	98	Marques et al., 2006
	<i>Arnoglossus laterna</i>	Arnoglosse lanterne	Portugal	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap, At, Hb As-Ap	13	78	Marques et al., 2006
	<i>Arnoglossus laterna</i>	Rombu bartardu	Italie	Mer de Ligurie	Non infecté par Anisakinae	-	0	1	Serracca et al., 2013
<i>Bramidae</i>	<i>Brama brama</i>	Brème de mer	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001
<i>Callionymidae</i>	<i>Callionymus lyra</i>	Gragonet	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001
<i>Carangidae</i>	<i>Carangoides bajad</i>	Carangue Bajad	Yemen	Mer rouge	Anisakinae	As, H. sp.	25,00 ; 20,00	20	Al-Zubaidy et al., 2012
	<i>Carangoides fuvogettatus</i>	Carangue pailletée	Yemen	Mer rouge	Anisakinae	As	15	20	Al-Zubaidy et al., 2012
	<i>Caranx sp</i>	Carangue	Indonésie	Mer Makassar sud	Anisakinae	Anisakis typel((As(ss),Ap,Az,At)	75	4	Anshary et al., 2014
	<i>Seriola lalandi</i>	Sériole chicard	Australie	Grande baie Australienne	Non infecté par Anisakinae	-	0	Inconnu	Shami et al., 2011
	<i>Seriola quinqueradiata</i>	-	Corée	Mer Jaune	Anisakinae	A. spp	10	10	Cho et al., 2012
	<i>Trachurus mediterraneus</i>	Chinchard à queue jaune	Turquie	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp.	60	30	Pekmezci et al., 2014
	<i>Trachurus picturatus</i>	Chinchard bleu	Portugal	Atl NE	Anisakinae	At, As (ss), Ap, Az, A. phys	62,5	40	Costa et al., 2003
	<i>Trachurus picturatus</i>	Chinchard bleu	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae	As	80,00 - 100,00	70	Manfredi et al., 2000
	<i>Trachurus spp.</i>	Chinchard	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+ Rhaphidascariidae	A. sp., H. sp	96,6	59	Angelucci et al., 2011

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
Corangiidae	<i>Trachurus trachurus</i>	Chincharid	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap	88	100	Abollo <i>et al.</i> , 2001
	<i>Trachurus trachurus</i>	Chincharid	Espagne	Atl NE, Mer méditerranée	Anisakinae + Raphidascarinae	As, Ha	39,4	360	Adroher <i>et al.</i> , 1996
	<i>Trachurus trachurus</i>	Chincharid	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	Ap, As, Ap, H. sp.	40	40	Chaligiannis <i>et al.</i> , 2011
	<i>Trachurus trachurus</i>	Chincharid	Espagne	Atl NE	Anisakinae	A. sp. type I, C sp., Ha	2,6	175	Gutiérrez-Galindo <i>et al.</i> , 2010
	<i>Trachurus trachurus</i>	Chincharid	France	non indiqué	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp	62,5	40	Huang, 1988
	<i>Trachurus trachurus</i>	Chincharid	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae	As	80,00 - 100,00	107	Manfredi <i>et al.</i> , 2000
	<i>Trachurus trachurus</i>	Chincharid	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	15,6	32	Serracca <i>et al.</i> , 2013
	<i>Prionace glauca</i>	Empereur	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap	100	25	Abollo <i>et al.</i> , 2001
	<i>Spicara smaris</i>	Jarret	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	Ap	3,84	26	Chaligiannis <i>et al.</i> , 2011
Cichlidae	<i>Spicara</i> spp.	-	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Rhaphida scaridae	A. sp., H. sp	66,6	3	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
	<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	-(eau douce)	Etats-Unis	Sud de Florida	Anisakinae	C. sp.	23,04-39,28	260	Bergman et Motta, 2004
Ciprinidae	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Rhaphida scaridae	A. sp., H. sp	100	1	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
Citharidae	<i>Citharus linguatula</i>	-	Portugal	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap, At, Hb As, Ap	48,30 - 85,30	485	Marques <i>et al.</i> , 2006
Clupeidae	<i>Alosa sapidissima</i>	Alose canadienne	Etats-Unis	Pacifique-Rivière	Anisakinae	As	100	12	Shields <i>et al.</i> , 2002
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	Norvège	Atl NE	Anisakinae	As	-	200	Levsen et Lunestad, 2010
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	France	Atl NE	Anisakinae	As	7-20	437	CEVPM, 1993
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	France	Inconnue	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp.	82,55	682	Huang, 1988
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	Royaume-Uni	Atl NE	Anisakinae	A. sp., C. sp.	-	5646	Khalil, 1969
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	Norvège	Atl NE	Anisakinae	A. sp.	43,6	78	Levsen <i>et al.</i> , 2005
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	Mer Baltique	Atl NE	Anisakinae	As	3,00 - 97,00	2823	Podolska et Horbowy, 2003
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	Mer du Nord	Atl NE	Anisakinae	A. sp.	92	884	Roepstorff <i>et al.</i> , 1993

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Clupeidae</i>	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	Ecosse	Atl NE	Anisakinae	A. sp	71,05	76	Smith et Wooten, 1975
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	Pologne	Atl NE-Baltique	Anisakinae+Rhaphidascarinae	As, Co, Ha, <i>Rhaphidascaris acus</i>	-	31091	Szostakowska et al., 2005
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng commun	Norvège	Atl NE	Anisakinae+Rhaphidascarinae	As, Ha	3-30	46	Tolonen et Karisbakk, 2003
	<i>Clupea pallasii</i>	Hareng du Pacifique	Corée	Mer de l'Est	Anisakinae	A. spp.	40	15	Cho et al., 2012
	<i>Clupea pallasii</i>	Hareng du Pacifique	Etats-Unis	Pacifique Nord	Anisakinae	As	-	non indiqué	Hauck et al., 1997
	<i>Clupea pallasii</i>	Hareng du Pacifique	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., P sp.	88	127	Myers, 1979
	<i>Clupea pallasii</i>	Hareng du Pacifique	Chine	Mer Jaune	Anisakinae+Rhaphidascaridae	As, H. sp.	100	5	Zhang et al., 2007
	<i>Konosirus punctatus</i>	-	Corée	Mer Jaune	Anisakinae	A. spp	26,7	15	Cho et al., 2012
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commun	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	50	Abollo et al., 2001
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commun	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp.	20	5	Angelucci et al., 2011
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commun	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	Ap	5,55	36	Chaligiannis et al., 2011
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commun	Espagne	Atl NE	Anisakinae	A. sp., type I	0	160	Gutiérrez-Galindo et al., 2010
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commun	France	non indiqué	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp.	4,55	22	Huang, 1988
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commun	Espagne	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp., H. sp.	14,12	85	Pulleiro-Potel et al., 2015
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commun	Espagne	Mer méditerranée	Rhaphidascarinae	Ha	9,09-25,21	214	Rello et al., 2008
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commun	Espagne	Atl NE	Rhaphidascarinae	Ha	3,4	145	Rello et al., 2008
	<i>Sardinella aurita</i>	Allache/Sardinella ronde	Italie	Mer méditerranée	Non infecté par Anisakinae	-	0	2	Angelucci et al., 2011
	<i>Sardinella aurita</i>	Allache/Sardinella ronde	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	A. sp.	4,54	22	Chaligiannis et al., 2011
	<i>Sardinops sagax</i>	Pilchard de Californie	Australie	Grande baie Australienne	Rhaphidascaridae	H. sp.	90	10	Shami et al., 2011
	<i>Sprattus sprattus</i>	Sprat	Royaume-Uni	Atl NE	Anisakinae	A. sp., C. sp.	-	840	Khaili, 1969
	<i>Sprattus sprattus</i>	Sprat	Pologne	Atl NE-Baltique	Anisakinae	-	0	non indiqué	Szostakowska et al., 2005

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
Congridae	<i>Conger conger</i>	Congre / conger eel	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss)	33,33	25	Abollo et al., 2001
	<i>Conger conger</i>	Congre / conger eel	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	50	2	Serracca et al., 2013
	<i>Conger myriaster</i>	Congre	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp.	100	20	Cho et al., 2012
	<i>Conger myriaster</i>	Congre	Corée	Mer Jaune	Anisakinae	A. spp.	100	10	Cho et al., 2012
<i>Corrhyphaenidae</i>	<i>Coryphaena hippurus</i>	Coryphène commune	Chine	Mer Jaune	Anisakinae	As	28,57	7	Zhang et al., 2007
Cottidae	<i>Myoxocephalus octodecemspinosus</i>	Chaboisseau à dix-huit épines	Canada	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	85,7	14	Pufall et al., 2012
	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Chaboisseau commun	Canada	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	50	26	Pufall et al., 2012
	<i>Scorpaenichthys marmoratus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	33	3	Myers, 1979
<i>Cynoglossidae</i>	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	-	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	14,3	7	Wei-Ma et al., 1997
<i>Embiotocidae</i>	<i>Embiotoca lateralis</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	0	1	Myers, 1979
<i>Engraulidae</i>	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Raphidascaridae	A. sp., H. sp	77	52	Angelucci et al., 2011
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	Ap	4,28	77	Chaligiannis et al., 2011
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Italie	Mer Adriatique	Anisakinae+Raphidascaridae	As, H. sp., As,	5,72	5696	Ciccarelli et al., 2011
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Italie	Mer Tyrhénie	Anisakinae + Raphidascarinae	Ap, Ha, A. sp.	0-4,6	1490	De Liberato et al., 2013
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Espagne	Atl NE	Anisakinae	A. sp. type I	0	153	Gutiérrez-Galindo et al., 2010
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	France	non indiqué	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp.	3,7	27	Huang, 1988
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Espagne	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp., C. sp.	4,48	67	Pulleiro-Potel et al., 2015
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Espagne	Atl NE et mer méditerranée	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp. I	31,95	792	Rello et al., 2009
<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Espagne	Atl NE et mer méditerranée	Anisakinae + Raphidascarinae	Ha	31,95	792	Rello et al., 2009	
<i>Gadidae</i>	<i>Boreogadus saida</i>	Cabillaud/ morue polaire	Canada	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	68,6	51	Pufall et al., 2012
<i>Gadidae</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>	Cabillaud/ morue du Pacifique	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., P. sp.	84	509	Myers, 1979

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Gadidae</i>	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	France	Atl NE	Anisakinae	-	1,7-7,90	non indiqué	Angot, 1993
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Canada	Nord-West d' Atl	Anisakinae	As, Pd, C. spp.	-	255	Bolly et Marcogliese, 1995
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Canada	Atl (Terre-Neuve et Labrador)	Anisakinae	As	9,85-66,52	12207	Bratney et Bishop, 1992
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Corée	Atl	Anisakinae	Pd	100	5	Chai et Guk, 1995
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	France	Atl NE	Anisakinae	-	0,5	208	Chord-Auger et al., 1995
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Islande	Atl NE	Anisakinae	A. sp. P. sp.	0,36	1382	Hauksson et al., 2012
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	France	non indiqué	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp.	9,09	11	Huang, 1988
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Canada	Nord-West d' Atl	Anisakinae	A. sp., Ha	35,00 - 100,00	24	Khan et Chandra, 2006
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Suède	Mer Baltique	Anisakinae	Pd	26	1043	Lunneryd et al., 2015
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Canada	Nord-West d' Atl	Anisakinae	As, Pd, Co	-	205	McClelland et Marcogliese, 1994
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Belgique	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	34,7	303	Piccolo et al., 1999
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Norvège	Atl NE	Anisakinae	As	80-100	183	Stromnes et Andersen, 1998
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Pologne	Atl NE-Baltique	Anisakinae	As, Co, Ha, Pd	0,00 - 60,00	3036	Szostakowska et al., 2005
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Eglefin	France	Atl NE	Anisakinae	-	18,7	non indiqué	Angot, 1993
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Eglefin	Allemagne	Mer du Nord	Raphidascarinae	Ha	100	308	Klimpel et Ruckert, 2005
	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	France	Atl NE	Anisakinae	-	3,5	non indiqué	Angot, 1993
	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	France	Atl NE	Anisakinae	-	44	402	Chord-Auger et al., 1995
	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	France	non indiqué	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp.	71,43	84	Huang, 1988
	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	Allemagne	Mer du Nord	Raphidascarinae	Ha	100	203	Klimpel et Ruckert, 2005
	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	Belgique	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	15,4	26	Piccolo et al., 1999
	<i>Microgadus tomcod</i>	Poulamon atlantique	Canada	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	7,7	26	Puffall et al., 2012

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)		Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Gadidae</i>	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap	91,16	147	Abollo <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Rhaphida scaridae	A. sp., H. sp	93,7	16	Angelucci <i>et al.</i> , 2011	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	Ap, As, As-Ap	100	4	Chaligiannis <i>et al.</i> , 2011	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Portugal	Atl NE	Anisakinae+Rhaphida scaridae	As, H. sp.	78,6	238	Cruz <i>et al.</i> , 2007	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Norvège	Atl NE	Anisakinae	A. sp.	52,6-89,70	78	Levsen <i>et al.</i> , 2005	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	53,68	329	Llarena-Reino <i>et al.</i> , 2012	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae	As	32,40 - 65,50	345	Manfredi <i>et al.</i> , 2000	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Turquie	Mer Egée	Anisakinae	A. sp.	75	8	Pekmezci <i>et al.</i> , 2014	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Espagne	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp.	16,67	18	Pulleiro-Potel <i>et al.</i> , 2015	
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Espagne	Mer méditerranée	Anisakinae	As, A. phys, Ha	10,63	24	Valero <i>et al.</i> , 2000	
	<i>Molva dypterygia</i>	Lingue Bleue	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss)	100	25	Abollo <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Molva dypterygia</i>	Lingue Bleue	France	Atl NE	Anisakinae	-	85	non indiqué	Angot, 1993	
	<i>Molva molva</i>	Lingue franche	Belgique	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	8,9	79	Piccolo <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Pollachius pollachius</i>	Lieu jaune	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo <i>et al.</i> , 2001	
	<i>Pollachius pollachius</i>	Lieu jaune	Belgique	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	82,9	70	Piccolo <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	France	Atl NE	Anisakinae	-	54,7	non indiqué	Angot, 1993	
	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	Ecosse	non indiqué	Anisakinae	-	100	non indiqué	Angot, 1993	
	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	France	Atl NE	Anisakinae	-	30	389	Chord-Auger <i>et al.</i> , 1995	
	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	Norvège	Atl NE, mer du Nord	Anisakinae	As	100	33	Klimpel <i>et al.</i> , 2004	
	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	Belgique	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	26,7	75	Piccolo <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	Norvège	Atl NE	Anisakinae	As	85-100	187	Stromnes et Andersen, 1998	

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Gadidae</i>	<i>Theragra chalcogramma</i>	Lieu jaune d'Alaska	Japon	Pacifique	Anisakinae	Co, As	31,00 - 100,00	107	Konishi et Sakurai, 2002
	<i>Theragra chalcogramma</i>	Lieu jaune d'Alaska	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	40	10	Myers, 1979
	<i>Trisopterus luscus</i>	Tacaud commun	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss)	32	25	Abollo et al., 2001
	<i>Trisopterus luscus</i>	Tacaud commun	Espagne	Atl	Anisakinae	A. sp., H. sp.	84,49	139	Rello et al., 2008
	<i>Trisopterus minutus</i>	Capelan de méditerranée	Espagne	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp., C. sp.	13,79	29	Pulleiro-Potel et al., 2015
<i>Gasterosteidae</i>	<i>Apeltes quadracus</i>	Épinoche à quatre épines	Canada	Nord-West d'Atl	Anisakinae	Pd	62	85	Marcogliese, 1996
	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Threespine stickleback	Canada	Nord-West d'Atl	Anisakinae	Pd	44	116	Marcogliese, 1996
	<i>Gobius cobitis</i>	Gobie à grosse tête	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Rhaphidascariidae	A. sp., H. sp	100	2	Angelucci et al., 2011
<i>Hexagrammidae</i>	<i>Hexagrammos decagrammus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	0	1	Myers, 1979
	<i>Hexagrammos otakii</i>	-	Corée	Mer de l'Est	Anisakinae	A. spp	30	10	Cho et al., 2012
	<i>Hexagrammos otakii</i>	-	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp	95	20	Cho et al., 2012
	<i>Hexagrammos otakii</i>	-	Corée	Mer Jaune	Anisakinae	A. spp	70	20	Cho et al., 2012
	<i>Hexagrammos otakii</i>	-	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	100	1	Wei-Ma et al., 1997
	<i>Ophiodon elongatus</i>	Terpuga	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	56	27	Myers, 1979
<i>Pleurogrammus</i>	<i>pleurogrammus azonus</i>	Terpuga	Corée	Mer de l'Est	Anisakinae	A. spp	70	10	Cho et al., 2012
	<i>Tetrapturus audax</i>	Marlin rayé	Nouvelle calédonie	Pacifique sud	Rhaphidascariinae	H. cenaticum	100	1	Moravec et Justine, 2005
<i>Labridae</i>	<i>Coris julis</i>	Girelle	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001
	<i>Labrus bergyllta</i>	vieille commune	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001
	<i>Symphodus melops</i>	Grénilabre commun	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001
<i>Lateolabracidae</i>	<i>Lateolabrax japonicus</i>	-	Corée	Mer Jaune	Anisakinae	A. spp	40	5	Cho et al., 2012
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	-	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	100	10	Wei-Ma et al., 1997

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
Lophiidae	<i>Lophius budegassa</i>	Baudroie rousse	Espagne	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp., H. sp.	5,56	36	Pulleiro-Potel et al., 2015
	<i>Lophius litulon</i>	Baudroie	Chine	Mer Jaune	Anisakinae	As	100	10	Zhang et al., 2007
	<i>Lophius piscatorius</i>	Baudroie	Espagne	AH NE	Anisakinae	As (ss)	100	25	Abollo et al., 2001
	<i>Lophius piscatorius</i>	Baudroie	Italie	Mer de Ligurie	Non infecté par Anisakinae	-	0	1	Serracca et al., 2013
Lutjanidae	<i>Lutjanus fulviflamma</i>	Vivaneau gibelot	Yemen	Mer rouge	Anisakinae	As	50	20	Al-Zubaidy et al., 2012
	<i>Lutjanus gibbus</i>	Vivaneau pagaie	Yemen	Mer rouge	Anisakinae	As, H. sp.	30	20	Al-Zubaidy et al., 2012
	<i>Lutjanus kasmira</i>	Vivaneau à raies bleues	Yemen	Mer rouge	Anisakinae	As	15	20	Al-Zubaidy et al., 2012
	<i>Pristipomoides filamentosus</i>	-	Yemen	Mer rouge	Anisakinae	As	23,3	30	Al-Zubaidy et al., 2012
	<i>Pristipomoides filamentosus</i>	-	Yemen	Mer rouge	Raphidascarinae	H. sp.	10	30	Al-Zubaidy et al., 2012
Macrouridae	<i>Macrourus berglax</i>	Grenadier	France	AH NE	Anisakinae	-	0	104	Chord-Auger et al., 1995
Merlucciidae	<i>Merluccius hubbi</i>	Merlu argentin	Amérique du Sud	San Matias Gulf	Anisakinae	A. sp., P. sp.	-	42	Herreras et al., 2000
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	Espagne	AH NE	Anisakinae	As (ss)	100	25	Abollo et al., 2001
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+ Raphidascaridae	A. sp., H. sp	62	50	Angelucci et al., 2011
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	Ap, As, H. sp.	66,6	36	Chaligiannis et al., 2011
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	France	non indiqué	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp.	88,57	35	Huang, 1988
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	Italie	Est de mer méditerranée	Anisakinae	Ap, At, A. phys	-	394	Mattiucci et al., 2004
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	Italie	Ouest de mer méditerranée	Anisakinae	Ap, A. phys	-	304	Mattiucci et al., 2004
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	Italie	AH NE	Anisakinae	Ap, As, At, Az, A. phys, Ab, A. sp.	-	243	Mattiucci et al., 2004
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	Turquie	Mer Egée	Anisakinae	A. sp.	80	10	Pekmezci et al., 2014
	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu commun	Italie	Mer de Ligurie	Non infecté par Anisakinae	-	0	4	Serracca et al., 2013
Moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bar commun	Italie	AH NE	Anisakinae	-	65,27-89,36	561	Bernardi, 2009
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bar commun	Egypte	Mer méditerranée et côte d'Egypte	Anisakinae	A. sp.	76,7	300	Morsy et al., 2012

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Moronidae</i>	<i>Dicentrarchus labrax**</i>	Bar commun	Espagne	Mer méditerranée	Non infecté par Anisakinae	-	-	259	Penalver et al., 2010
<i>Mullidae</i>	<i>Mullus barbatus</i>	Rouget barbet	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	As	5,55	18	Chaligiannis et al., 2011
	<i>Mullus barbatus</i>	Rouget barbet	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae	As	3,40 - 24,50	223	Manfredi et al., 2000
	<i>Mullus barbatus</i>	Rouget barbet	Turquie	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp.	41,6	12	Pekmezci et al., 2014
	<i>Mullus barbatus</i>	Rouget barbet	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	25,4	67	Serracca et al., 2013
	<i>Mullus spp.</i>	Rouget	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Raphididas caridae	A. sp., H. sp	79	48	Angelucci et al., 2011
	<i>Mullus surmuletus</i>	Rouget de roche	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001
	<i>Mullus surmuletus</i>	Rouget de roche	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae	As	6,80 - 55,60	77	Manfredi et al., 2000
	<i>Mullus surmuletus</i>	Rouget de roche	Espagne	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp., H. sp.	33,3	21	Pulleiro-Potel et al., 2015
<i>Phycidae</i>	<i>Phycis biennoides</i>	Loche	Tunisie	Est de mer méditerranée	Anisakinae + Raphidascarinae	As(s), A. phys., Ha, Hf	53,75	272	Farjallah et al., 2006
	<i>Phycis phycis</i>	Mustella	Tunisie	Est de mer méditerranée	Anisakinae + Raphidascarinae	As(s), Aphys., Ha, Hf	51,47	320	Farjallah et al., 2006
<i>Pleuronectidae</i>	<i>Hippoglossoides elassodon</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	0	1	Myers, 1979
	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Flétan nain	Canada	Nord-West d' Atl	Anisakinae	As, Pd, C. sp.	-	160	Boily et Marcogliese, 1995
	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Flétan nain	Norvège	Atl NE	Anisakinae	Pd C	0-44	248	Bristow et Berland, 1992
	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Flétan nain	Canada	Nord-West d' Atl	Anisakinae	Pd	14,00 - 100,00	28065	McClelland et al., 2000
	<i>Hypoglossoides pinetorum</i>	Flétan nain	Corée	Mer de l'Est	Anisakinae	A. spp	70	10	Cho et al., 2012
	<i>Isopsetta isolepis</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	29	24	Myers, 1979
	<i>Lyopsetta exilis</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	100	3	Myers, 1979
	<i>Microstomus pacificus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	67	9	Myers, 1979
	<i>Parophrys vetulus</i>	Carlottin anglais	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	13	117	Myers, 1979
	<i>Platichthys bicoloratus</i>	-	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	100	2	Wei-Ma et al., 1997
	<i>Platichthys flesus</i>	Flet d'Europe	Portugal	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap, At, Hb, As-Ap	3	34	Marques et al., 2006

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Pleuronectidae</i>	<i>Platichthys stellatus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	5	25	Myers, 1979
	<i>Pleuronichthys cornutus</i>	Carlotin méitagare	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp	16,7	30	Cho et al., 2012
	<i>Psettichthys melanosicticus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	75	4	Myers, 1979
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Flétan du Groenland	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	100	5	Myers, 1979
<i>Rajidae</i>	<i>Raja asterias</i>	Raie étoilée	Italie	Mer de Ligurie	Non infecté par Anisakinae	-	0	3	Serracca et al., 2013
	<i>Raja porosa</i>	-	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	16,7	6	Wei-Ma et al., 1997
<i>Salmonidae</i>	<i>Coregonus huntsmani*</i>	-	Canada	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	64	25	Pufall et al., 2012
	<i>Oncorhynchus keta</i>	Saumon du Pacifique	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	100	1	Myers, 1979
	<i>Oncorhynchus keta*</i>	Saumon du Pacifique	Corée	Péninsule de Corée	Anisakinae	A. sp.p	100	120	Setyobudi et al., 2011
	<i>Oncorhynchus keta</i> ND	Saumon du Pacifique	Etats-Unis	Pacifique Nord	Anisakinae	A. sp.	39-41	194	Novotny et Uzmman, 1960
	<i>Oncorhynchus kisutch****</i>	Saumon argenté	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., P.sp.	36	55	Myers, 1979
	<i>Oncorhynchus masoumasou****</i>	Saumon japonais	Corée	Mer de l'Est	Anisakinae	A. spp.	72,7	11	Cho et al., 2012
	<i>Oncorhynchus nerka*</i>	Saumon rouge	Etats-Unis	Détroit de Puget	Anisakinae	A. sp	100	50	Deardorff et Kent, 1989
	<i>Oncorhynchus nerka****</i>	Saumon rouge	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., P. sp.	40	10	Myers, 1979
	<i>Salmo salar</i>	Saumon atlantique	Norvège, Ecosse	Norvège, Ecosse	Anisakinae	-	0	non indiqué	Angot, 1993
	<i>Salmo salar**</i>	Saumon atlantique	Norvège	Atl NE	Nematodés	-	0	1180	Lunestad, 2003
	<i>Salmo salar**</i>	Saumon atlantique	Ecosse	Atl	Non infecté par Anisakinae	-	0	720	Wootten et al., 2010
	<i>Salmo salar**</i>	Saumon atlantique	Ecosse	Atl	Anisakinae	As	100	55	Wootten et al., 2010
	<i>Salmo salar****</i>	Saumon atlantique	Canada	Atl NE	Anisakinae	A. sp.	0,11	894	Marty, 2008
	<i>Salmo salar****</i>	Saumon atlantique	Norvège	Atl NE	Anisakinae+ Rhaphidascaridae	As	20	50	Mo et al., 2013
	<i>Salmo salar</i> ND	Saumon atlantique	Canada	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	8,3	36	Pufall et al., 2012
	<i>Salmo trutta*</i>	Truite	Ecosse	Atl	Anisakinae	As	100	5	Wootten et al., 2010

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Salmonidae</i>	<i>Salvelinus alpinus*</i>	Omble chevalier	Canada	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	18,2	22	Puffall <i>et al.</i> , 2012
<i>Sciaenidae</i>	<i>Dendrophysa russelli</i>	Bourrue chèvre	Thaïlande	golfe de Thaïlande	Anisakinae	A. sp.	-	120	Nuchjangreed <i>et al.</i> , 2007
	<i>Johnius carouna</i>	Courbine caroune	Thaïlande	golfe de Thaïlande	Anisakinae	A.sp	-	120	Nuchjangreed <i>et al.</i> , 2006
	<i>Nibea albiflora</i>	-	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	90	50	Wei-Ma <i>et al.</i> , 1997
	<i>Pennahia argentata</i>	Saint-Pierre	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	76	25	Wei-Ma <i>et al.</i> , 1997
	<i>Pseudosciaena polyactis</i>	-	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	70	10	Wei-Ma <i>et al.</i> , 1997
<i>Scombridae</i>	<i>Auxis thazard</i>	Cavallinu	Indonésie	Mer Makassar sud	Anisakinae	<i>Anisakis</i> type I (As(ss),Ap,Az,AT)	46,7	30	Anshary <i>et al.</i> , 2014
	<i>Euthynnus affinis</i>	-	Indonésie	Mer Makassar sud	Anisakinae	<i>Anisakis</i> type I (As(ss),Ap,Az,AT)	66,7	3	Anshary <i>et al.</i> , 2014
	<i>Katsuwonus pelamis</i>	Bonite à ventre rayé	Indonésie	Mer Makassar sud	Anisakinae	<i>Anisakis</i> type I (As(ss),Ap,Az,AT)	92,3	13	Anshary <i>et al.</i> , 2014
	<i>Pneumatophorus japonicus</i>	Strumbulu	Chine	Mer Jaune	Anisakinae	As	83,33	12	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rastrelliger kanagurta</i>	Maquereau indien	Indonésie	Mer Makassar sud	Anisakinae	<i>Anisakis</i> type I (As(ss),Ap,Az,AT)	5	20	Anshary <i>et al.</i> , 2014
	<i>Scomber australasicus</i>	Maquereau tacheté	Taiwan	Pacifique Nord	Anisakinae	Ap, Ab, Apag, A. phys, At, As-Ap.	72,8	250	Chen <i>et al.</i> , 2015
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Maroc	Mer méditerranée	Anisakinae	Ap, As-Ap	28,1	135	Abattouy <i>et al.</i> , 2011
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Maroc	Atl NE	Anisakinae	Ap, As(ss), As-Ap	41,22	131	Abattouy <i>et al.</i> , 2011
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Corée	Péninsule de Corée	Anisakinae+Rhaphidas caridae	Ap, As(ss), H. sp.	-	417	Bak <i>et al.</i> , 2014
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	Ap, As, As-Ap	95,8	24	Chaligiannis <i>et al.</i> , 2011
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Portugal	Atl NE	Anisakinae	At, As(ss), Ap, Az, A. phys, A sp. type I & II	56,70 - 80,80	154	Costa <i>et al.</i> , 2003
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau commun	France	non indiqué	Anisakinae	As, Pd, Ha, C-sp	29,91	214	Huang, 1988
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Turquie	Mer Egée	Anisakinae	A. sp.	100	10	Pekmezci <i>et al.</i> , 2014
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Japon	Mer de Japon et Pacifique Nord	Anisakinae	A. sp. type I	74,31	218	Suzuki <i>et al.</i> , 2010
<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Japon	Mer de Japon	Anisakinae	Ap, As(ss)	74,3	218	Uzuki <i>et al.</i> , 2009	
<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As(ss), Ap	74,54	55	Abollo <i>et al.</i> , 2001	

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
Scombridae	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Rhaphididae caridae	A. sp., H. sp	77,8	9	Angelucci, Meloni et al., 2011
	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	Ap,As,As-Ap,H. sp.	100	5	Chaligiannis et al., 2011
	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Espagne	Atl NE	Anisakinae	A. sp. type I, C sp., Ha	11	447	Gutiérrez-Galindo et al., 2010
	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Norvège	Atl NE	Anisakinae	A. sp.	93,8-97,9	48	Levsen et al., 2005
	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	30,96	236	Llarena-Reino et al., 2012
	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Turquie	Atl NE	Anisakinae	A. sp.	25	40	Pekmezci, 2014
	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Turquie	Mer Egée	Anisakinae	A. sp.	100	8	Pekmezci et al., 2014
	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Espagne	Mer méditerranée	Non infecté par Anisakinae	-	0	6	Pulleiro-Patel et al., 2015
	<i>Scomberomorus cavalla</i>	Thazard barré	Brésil	Côte de Brésil	Anisakinae	A.sp, C. sp.	-	30	Dias et al., 2011
	<i>Scomberomorus niphonius</i>	-	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	60	15	Wei-Ma et al., 1997
	<i>Scomberomorus niphonius</i>	-	Chine	Mer Jaune	Anisakinae	As	90,47	21	Zhang et al., 2007
	<i>Thunnus alalunga</i>	Thon blanc	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema sp.	2	10	Myers, 1979
<i>Thunnus tonggol</i>	-	Iran	golfe de Persian	Anisakinae+Rhaphididae caridae	A. sp., Raphidascaris.sp	89	100	Eslami et al., 2011	
Scophthalmidae	<i>Lepidorhombus bosci</i>	-	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss) , Ap	100	25	Abollo et al., 2001
	<i>Lepidorhombus bosci</i>	-	Portugal	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap, At, Hb As-Ap	4,90 - 17,50	361	Marques et al., 2006
	<i>Scorpaena porcus</i>	Rascasse brune	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp	40	5	Angelucci et al., 2011
Scorpaenidae	<i>Scorpaena scrofa</i>	Cappone	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss) , Ap	100	25	Abollo et al., 2001
	<i>Scorpaena scrofa</i>	Cappone	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	100	1	Serracca et al., 2013
	<i>Scorpaenodes littoralis</i>	-	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp	70	10	Cho et al., 2012
Scyliorhinidae	<i>Scyliorhinus canicula</i>	Petite roussette	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001
Sebastidae	<i>Helicolenus dactylopterus</i>	Rascasse de fond	Espagne	Mer méditerranée	Non infecté par Anisakinae	-	0	3	Pulleiro-Patel et al., 2015
	<i>Helicolenus dactylopterus</i>	Rascasse de fond	Italie	Mer de Ligurie	Non infecté par Anisakinae	-	0	1	Serracca et al., 2013

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Sebastidae</i>	<i>Sebastes alatus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	45	220	Myers, 1979
	<i>Sebastes auriculatus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	40	10	Myers, 1979
	<i>Sebastes babcocki</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	12	32	Myers, 1979
	<i>Sebastes brevispinis</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	55	47	Myers, 1979
	<i>Sebastes caurinus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	20	10	Myers, 1979
	<i>Sebastes chlorostictus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	25	4	Myers, 1979
	<i>Sebastes crameri</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	100	5	Myers, 1979
	<i>Sebastes dipolaraa</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	100	1	Myers, 1979
	<i>Sebastes elongatus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	58	12	Myers, 1979
	<i>Sebastes entomelas</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	100	22	Myers, 1979
	<i>Sebastes flavidus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	77	102	Myers, 1979
	<i>Sebastes goodei</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	89	19	Myers, 1979
	<i>sebastes inermis</i>	-	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp	72,7	11	Cho et al., 2012
	<i>Sebastes maliger</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	7	26	Myers, 1979
	<i>Sebastes marinus</i>	Grand Sébaste	France	Atl NE	Anisakinae	-	6,7	Inconnu	Angot, 1993
	<i>Sebastes marinus</i>	Grand Sébaste	France	Inconnue	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp.	86,11	36	Huang, 1988
	<i>Sebastes marinus</i>	Grand Sébaste	Belgique	Atl NE	Anisakinae	As, Pd	3,8	1026	Piccolo et al., 1999
	<i>Sebastes marinus</i>	Grand Sébaste	Norvège	Atl NE	Anisakinae	As	35-80	198	Stromnes et Andersen, 1998
	<i>Sebastes mentella</i>	Sébaste du Nord	Norvège	Atl NE	Anisakinae+Rhaphididae cardae	As, Ha	2-79	100	Klapper et al., 2015
	<i>Sebastes paucispinis</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	95	68	Myers, 1979
	<i>Sebastes pinnger</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	93	179	Myers, 1979
	<i>Sebastes reberimus</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	0	1	Myers, 1979

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références	
Sebastidae	<i>Sebastes rufis</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	100	4	Myers, 1979	
	<i>Sebastes saxicola</i>	-	Etats-Unis	Pacifique	Anisakinae	A. sp., Phocanema. sp.	9	11	Myers, 1979	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	-	Corée	Mer de l'Est	Anisakinae	A. spp	70	10	Cho et al., 2012	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	-	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp	100	30	Cho et al., 2012	
	<i>Sebastes thompson</i>	-	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp	100	20	Cho et al., 2012	
	<i>Sebasticus marmoratus</i>	-	Chine	Mer Jaune	Anisakinae	As	10,34	29	Zhang et al., 2007	
	<i>Setastes schlegeli</i>	-	Corée	Mer Jaune	Anisakinae	A. spp	40	10	Cho et al., 2012	
	Serranidae	<i>Cephalopholis cyanostigma</i>	Vieille étoiles bleues	Indonésie	Mer Makassar sud	Anisakinae	Anisakis typel(As(ss),Ap,Az,At)	12,5	8	Anshary et al., 2014
<i>Epinephelus guttatus</i>		Mérrou	Yemen	Mer rouge	Anisakinae+Rhaphidascariidae	As, H. sp.	25,00/45,00	20	Al-Zubaidy et al., 2012	
<i>Epinephelus tauvina</i>		Loche mouchetée	Yemen	Mer rouge	Rhaphidascariinae	H. sp.	10	20	Al-Zubaidy, et al., 2012	
<i>Epinephelus tauvina</i>		Loche mouchetée	Yemen	Mer rouge	Anisakinae	As, H. sp.	5	20	Al-Zubaidy et al., 2012	
<i>Serranus cabrilla</i>		Serran commun	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Rhaphidascariidae	A. sp., H. sp	100	3	Angelucci et al., 2011	
<i>Serranus scriba</i>		Serran écriture	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Rhaphidascariinae	A. sp., H. sp.	100	3	Serracca et al., 2013	
Soleidae		<i>Dicologlossa cuneata</i>	-	Portugal	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap, At, Hb As-Ap	4	120	Marques et al., 2006
		<i>Solea senegalensis</i>	-	Portugal	Atl NE	Anisakinae	As (ss), Ap, At, Hb As-Ap	1,3	80	Marques et al., 2006
Sparidae	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Pagretête noire	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp	20	10	Cho et al., 2012	
	<i>Boops boops</i>	Bogue	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	H. sp.	4,34	46	Chaligiannis et al., 2011	
	<i>Boops boops</i>	Bogue	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Rhaphidascariinae	A. sp., H. sp.	33,3	18	Serracca et al., 2013	
	<i>Diplodus annularis</i>	Sparailon	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Rhaphidascariinae	A. sp., H. sp.	33,3	3	Serracca et al., 2013	
	<i>Diplodus sargus</i>	Sar commun	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo et al., 2001	
	<i>Diplodus sargus</i>	Sar commun	Italie	Mer de Ligurie	Non infecté par Anisakinae	-	0	2	Serracca et al., 2013	

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Sparidae</i>	<i>Evygnis japonica</i>	-	Corée	Mer de Sud	Anisakinae	A. spp	100	10	Cho, Lee <i>et al.</i> , 2012
	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Mermura	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Rhaphidas caridae	A. sp., H. sp	33,3	6	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Mermura	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	9,1	11	Serracca <i>et al.</i> , 2013
	<i>pagellus acarne</i>	Pageot blanc	Italie	Mer de Ligurie	Non infecté par Anisakinae	-	0	3	Serracca <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pagellus acarne</i>	pageot blanc	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Rhaphidas caridae	A. sp., H. sp	100	2	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Dorade rose	Portugal	Atl NE	Anisakinae + Raphidascarinae	As, Ap, H. sp.	81,30 - 96,30	34	Costa <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Dorade rose	Portugal	Mer de Portugal	Anisakinae	A,sp	36-100	269	Hermida <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pagellus erythrinus</i>	Pageot	Grèce	Mer Egée	Anisakinae	A. sp.	11,76	17	Chaligiannis <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pagellus erythrinus</i>	Pageot	Espagne	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp., H. sp., C. sp.	33,3	9	Pulleiro-Potel <i>et al.</i> , 2015
	<i>Pagellus erythrinus</i>	Pageot	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	15,6	32	Serracca <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pagrus pagrus</i>	Paragu	Brésil	Rio de Janeiro	Anisakinae	A. sp., C. sp., H. sp.	19,4	36	Saade et Luque, 2009
	<i>Sparus aurata</i>	Dorade royale	Espagne	Atl NE	Anisakinae	-	0	25	Abollo <i>et al.</i> , 2001
	<i>Sparus aurata</i>	Dorade royale	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae	A. sp.	20	10	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
	<i>Sparus aurata</i>	Dorade royale	Espagne	Mer méditerranée	Non infecté par Anisakinae	-	-	612	Penalver <i>et al.</i> , 2010
	<i>Spondyliosoma cantharus</i>	Dorade grise	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss)	80	25	Abollo <i>et al.</i> , 2001
	<i>Spondyliosoma cantharus</i>	Brême de mer	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	100	1	Serracca <i>et al.</i> , 2013
<i>Sphyrnidae</i>	<i>Sphyaena barracuda</i>	Brisure	Yemen	Mer rouge	Anisakinae+Rhaphidas caridae	As, H. sp	6,7; 20	15	Al-Zubaidy <i>et al.</i> , 2012
	<i>Sphyaena jello</i>	Barracuda jello	Yemen	Mer rouge	Anisakinae	As, H. sp	26,7	15	Al-Zubaidy <i>et al.</i> , 2012
<i>Sternoptychidae</i>	<i>Maurolicus muelleri</i>	Brossé améthyste	Norvège	Atl NE-Mer du Nord	Anisakinae	As	30-100	20	Klimpel <i>et al.</i> , 2004
<i>Synodontidae</i>	<i>Saurida undosquamis</i>	-	Egypte	Mer Rouge	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp.(typell), H. patagonense	75	120	Morsy <i>et al.</i> , 2015
<i>Tracichthyidae</i>	<i>Hoplostethus mediterraneus</i>	Poisson-montre	Italie	Mer méditerranée	Non infecté par Anisakinae	-	0	2	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
<i>Trichiuridae</i>	<i>Aphanopus carbo</i>	Sabre noir	Portugal	Atl NE	Anisakinae	As (SS), AP, AZ, Aphys. Ab, A sp. tyept	71,40 - 100,00	142	Costa <i>et al.</i> , 2003

Famille	Nom espèce en latin	Nom commun	Pays (soit de pêche soit d'analyse)	Zone de pêche	Famille Parasites	Espèce Parasites	Prévalence infesté par Anisakidae	Nombre individus analysés	Références
<i>Trichiuridae</i>	<i>Trichiurus haumela</i>	Poisson sabre commun	Chine	Mer Bohai	Anisakinae	As	100	6	Wei-Ma <i>et al.</i> , 1997
	<i>Trichiurus lepturus</i>	Sabre	Brésil	Côte de Rio de Janeiro	Anisakinae+Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	100	64	Novo Borges <i>et al.</i> , 2012
	<i>Trichiurus</i> spp.	-	Japon, Taiwan	Côte de Taiwan et Japon	Anisakinae	A. sp.	14,28-100	7	Umehara, Kawakami <i>et al.</i> , 2010
<i>Triglidae</i>	<i>Aspitrigla cuculus</i>	Grondin rouge	France	Inconnue	Anisakinae	As, Pd, Ha, C. sp.	86,36	22	Huang, 1988
	<i>Chelidonichthys obscurus</i>	Grondin sombre	Italie	Mer de Ligurie	Anisakinae + Raphidascarinae	A. sp., H. sp.	16,7	6	Serracca <i>et al.</i> , 2013
	<i>Eutrigla gurnardus</i>	gurnard	Espagne	Atl NE	Anisakinae	As (ss)	68	25	Abollo <i>et al.</i> , 2001
	<i>Trigloporus lastoviza</i>	Grondin strié	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Raphidascaridae	A. sp., H. sp	100	1	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
<i>Zeidae</i>	<i>Zeus faber</i>	Jean dorée	Italie	Mer méditerranée	Anisakinae+Raphidascaridae	A. sp., H. sp	100	10	Angelucci <i>et al.</i> , 2011
	<i>Zeus faber</i>	Jean dorée	Turquie	Mer Egée	Anisakinae	A. sp.	100	1	Pekmezci <i>et al.</i> , 2014
Zones de pêche et signe									
Atl: océan Atlantique, Atl NE : océan Atlantique Nord-Est, Atl -NW: Nord-Ouest de l'Atlantique, * : sauvage, ** : élevage, *** : élevage ouvert en mer, **** : achat du marché, ND : non déterminé									
Espèces de parasites									
As : <i>A. simplex</i> , As(ss): <i>A. simplex</i> (sensu stricto), A. sp. : <i>Anisakis</i> sp., As(s): <i>A. simplex</i> (sensu lato), As-As: <i>A. simplex</i> x <i>A. pegreffii</i> , Ab : <i>A. brevispiculata</i> , Aphys: <i>A. physeteris</i> , Az: <i>A. ziphidarum</i> , Ap: <i>A. pegreffii</i> , At : <i>A. typica</i> , C. sp. : <i>Contracaecum</i> sp., Co : <i>C. osculatum</i> , H. sp. : <i>Hysterothylacium</i> sp., Ha: <i>H. aduncum</i> , Hf: <i>H. fabri</i> , P. sp. : <i>Pseudoterranova</i> sp., Pd : <i>P. decipiens</i>									

Annexe 7 : Identification des *Blastocystis* et *Cryptosporidium* dans les poissons et mammifères marins pour le programme ABC-Fish.

L'identification des *Blastocystis* spp. et *Cryptosporidium* spp. fait partie de travail de thèse. Ce travail fait partie du programme ABC-Fish qui débute en 2014 et se terminera en 2016. Ce travail est donc en cours de réalisation. Les échantillons de poissons prévus sont décrits dans le Tableau I.

Tableau I Echantillons poissons pour le programme ABC-Fish

Lot	Espèce	Date de pêche	Zone de pêche		Nb individus
Ch I	<i>Clupea harengus</i>	14/01/2014	27.VII.d	Eastern English Channel	32
Ch II	<i>Clupea harengus</i>	02/12/2014	27.VII.d	Eastern English Channel	30
Ch III	<i>Clupea harengus</i>	14/02/2015	27.VII.d	Eastern English Channel	30
Ch IV	<i>Clupea harengus</i>	05/03/2015	27.VII.d	Eastern English Channel	30
Mm I	<i>Merlangius merlangus</i>	08/08/2014	27.IV.b	Central North Sea	30
Mm II	<i>Merlangius merlangus</i>	01/10/2014	27.VII.d	Eastern English Channel	30
Mm III	<i>Merlangius merlangus</i>	13/12/2014	27.VII.d	Eastern English Channel	30
Mm IV	<i>Merlangius merlangus</i>	27/01/2015	27.VII	Irish Sea, West of Ireland, Porcupine Bank, Eastern and Western English Channel, Bristol Channel, Celtic Sea North and South, and Southwest of Ireland - East and West	30
Pv I	<i>Pollachius virens</i>	16/05/2014	27.II.a	Norwegian Sea	22
Pv II	<i>Pollachius virens</i>	27/07/2014	27.IV.a	Northern North Sea	30
Pv III	<i>Pollachius virens</i>	02/10/2014	27.IV.a	Northern North Sea	30
Pv IV	<i>Pollachius virens</i>	27/11/2014	27.IV.a	Northern North Sea	30
Pv V	<i>Pollachius virens</i>	30/03/2015	27.IV.a	Northern North Sea	30
Ss I	<i>Scomber scombrus</i>	07/08/2014	27.VII.d	Eastern English Channel	30
Ss II	<i>Scomber scombrus</i>	17/09/2014	ND	ND	30
Ss III	<i>Scomber scombrus</i>	01/10/2014	27.VII.d	Eastern English Channel	30
Ss IV	<i>Scomber scombrus</i>	13/05/2015	27.VII.d	Eastern English Channel	30

Le protocole d'extraction d'ADN ainsi que les résultats de séquençage sont comme suivant.

i) Identification de *Blastocystis* spp. chez les poissons et mammifère marins.

L'extraction d'ADN les échantillons ont été fait à l'aide du kit QIAamp Fast DNA stool mini, Qiagen, France).

La préparation de la gamme étalon plasmidique est réalisée à l'aide d'un kit clonage TOPO TA Cloning, invitrogen, France .

Le mélange réactionnel et le cycle de *qPCR* est comme suivant :

Tableau II : Le mélange réactionnel pour la *qPCR* de *Blastocystis* spp.

Produits	Quantité de produits(µL)
Eau	13,4
MgCl ₂	2
Amorce Forward BL18SPPF1(final 150 nM)	0,3
Amorce Reverse BL18SR2PP(finale 150 nM)	0,3
MasterMix	2
ADN	2
Volume total	20

Le kit de masterMix est Brilliant II SYBR® Green *qPCR* Mastermix (Stratagene, USA).

Tableau III : Cycle *qPCR* pour la détection *Blastocystis* spp.

Etapas	Température	Temps	Répétition
Pré-dénaturation	95°C	5 min	non
Dénaturation	95°C	5 sec	X 45 cycles
Hybridation	60°C	10 sec	
Elongation	72°C	20 sec	

La *qPCR* est réalisé sur l'appareil RotorGene, Corbett Life Science, Australia

ii) Identification de *Cryptosporidium* spp. chez les poissons et mammifère marins.

L'extraction d'ADN est faite à l'aide du kit NucleoSpin®96 Tissue-centrifuge processing, Macherey-Nagel, France).

Tableau IV : Mélange réactionnel de la *PCR* nichée I *Cryptosporidium* spp.

Produits	Quantité de produits (µL)
Eau	22,7
Tampon 10x	5
MgCl ₂ 25 mM	4
dNTPs 2,5 mM	4
Primer F ext 10 mM	2
Primer R ext 10 mM	2
Taq Polymérase Hot starTaq 5 U,µL ⁻¹	0,3
ADN(dilué 1/10)	10

Tableau VI : Cycle de la PCR nichée I pour la détection de *Cryptosporidium* spp.

Etapes	Température	Temps	Répétition
Pré-dénaturation	94°C	10 min	non
Dénaturation	94°C	45 sec	x 45 cycles
Hybridation	62°C	45 sec	
Elongation	72°C	5 sec	
	4°C	Forever	-

Tableau VI : Mélange réactionnel de la PCR nichée II *Cryptosporidium* spp.

Produits	Quantité de produits (µL)
Eau	28,7
Tampon 10x	5
MgCl ₂ 25 mM	6
dNTPs 2,5 mM	4
Primer F int 10 mM	2
Primer R int 10 mM	2
Taq Polymérase	0,3
ADN de produit PCR 1	2

Tableau VII : Cycle de la PCR nichée II pour la détection de *Cryptosporidium* spp.

Etapes	Température	Temps	Répétition
Pré-dénaturation	94°C	10 min	non
Dénaturation	94°C	45 sec	x 40 cycles
Hybridation	62°C	45 sec	
Elongation	72°C	1 min	
	4°C	Forever	-

Les produits de PCR positifs de *Blastocystis* spp. et *Cryptosporidium* spp. ont été envoyés pour séquençage à un prestataire extérieur. Chaque produit de PCR a été séquençé dans les deux sens. Les séquences complémentaires d'un même produit amplifié ont été comparées de façon à corriger les éventuelles erreurs de séquençage sur le logiciel Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) et à obtenir une séquence "consensus" pour chaque individu analysé. Cette séquence consensus a été comparée aux séquences déposées dans GenBank en utilisant le programme Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, BLAST (Altschul *et al.*, 1990) afin d'identifier l'espèce d'*Blastocystis* et *Cryptosporidium* à laquelle l'individu appartient.

iii) Résultats préliminaires de l'identification de *Blastocystis* spp. et *Cryptosporidium* spp. dans les poissons marins consommés et chez mammifère marin échoué en France.

Tableau VIII : Résultat préliminaire de *Blastocystis* spp. chez les poissons et les marsouins

Echantillon	Organe	Espèces de poisson	Nom commun	Zone de pêche		méthode	Sous-type	% identité
CHII 1	BO	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	PCR	ST10	92%
CHII 1	ST	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	PCR	ST8	100%
CHII7 ST	C	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	MP cl3	ST10	91%
CHII7 ST	C	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	MP cl9	ST10	92%
CHII7 ST	C	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	MP cl10	ST10	91%
CHII7 ST	BO	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	PCR	ST10	92%
CHII7 ST	ST	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	PCR	ST8	100%
CHII8	C	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	qPCR	ST10	92%
CHII8	ST	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	PCR	ST7	97%
CHII8	ST	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	qPCR	ST7	98%
PVIV 3	C	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	qPCR	ST10	92%
PVIV 3	ST	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	PCR	ST8	100%
SSIII 1	C	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	IV_a	Northern North Sea	qPCR	ST10	92%
SSII 46	C	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	IV_a	Northern North Sea	qPCR	ST2	100%
MMIII 3	C	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	IV_a	Northern North Sea	qPCR	ST2	100%
CHII 2	C	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	27.VII.d	Eastern English Channel	qPCR	ST8	100%
Marsouin 2I	C	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsouin commun	27.VII.d	Eastern English Channel	qPCR	ST8	91%
Marsouin 1R	C	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsouin commun	27.VII.d	Eastern English Channel	qPCR	ST2	99%
Marsouin 1I	C	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsouin commun	27.VII.d	Eastern English Channel	MP cl2	ST4	99%
Marsouin 1I	C	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsouin commun	27.VII.d	Eastern English Channel	MP cl5	Gera3b	85%
Marsouin 1I	C	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsouin commun	27.VII.d	Eastern English Channel	MP cl9	Geca2	82%
Marsouin 1B	C	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsouin commun	27.VII.d	Eastern English Channel	qPCR	ST3	99%

BO: grattage intestinal

ST: grattage estomac

C: contenu intestinal

Au total 4 sous-types ont été identifiés chez le hareng (l'Est de la Manche), le merlan, le maquereau commun et le lieu noir (Nord de la mer du Nord). Plusieurs espèces de poisson de la mer du Nord étaient infectées par *Blastocystis*. Quatre sous-types ont été identifiés chez les marsouin. Ces résultats préliminaires sont encourageants puisqu'il s'agit de la première description de *Blastocystis* dans le poisson.

Tableau IX : Résultat préliminaire de *Cryptosporidium* spp. chez poissons

Echantillons	Organe	Espèces de poisson	Nom commun	Zone de pêche		méthode	Genre	Espèce	% identité
PV_III_4	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	Molnari	95%
PV_III_4	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			
PV_III_9	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	Molnari	95%
PV_III_9	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			
PV_IV_2	ST	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	Molnari	95%
PV_IV_2	ST	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			
PV_IV_3	ST	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	Molnari	95%
PV_IV_3	ST	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			
PV_IV_7	ST	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	sp.	94%
PV_IV_7	ST	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			
PV_IV_10	ST	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	sp.	95%
PV_IV_10	ST	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			
PV_IV_1	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	Molnari	95%
PV_IV_1	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			
PV_IV_2	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	Molnari	94%
PV_IV_2	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			
PV_IV_6	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR	Cryptosporidium	sp.	95%
PV_IV_6	BO	Pollachius virens	Lieu noir	IV_a	Northern North Sea	Nested PCR			

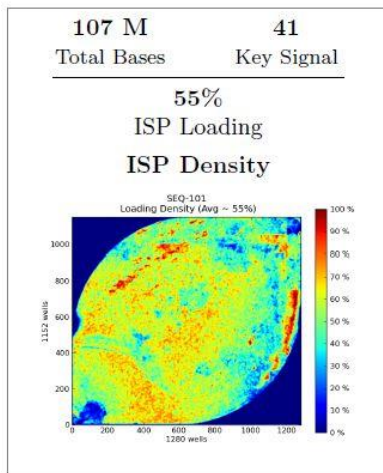
BO: grattage intestinal

ST: grattage estomac

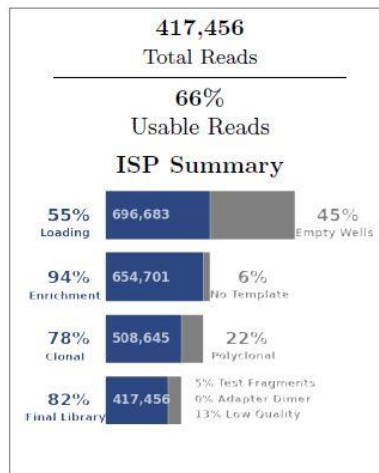
C: contenu intestinal

Cryptosporidium molnari et *C. spp.* ont été identifiés chez lieu noir provenant de nord de la mer du Nord. Le résultat de cette étude peut être utilisé pour comparer avec des études faites chez le poisson dans le programme *Fish-Parasites*.

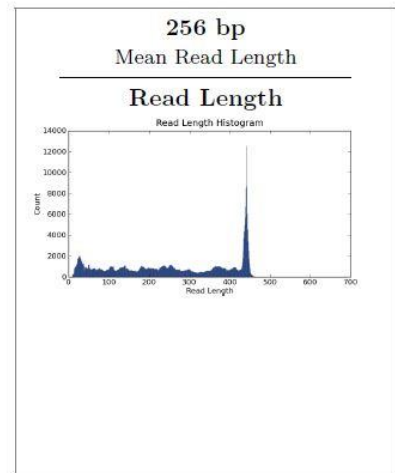
Annexe 8 : Résumé issu du séquençage HTS pilote



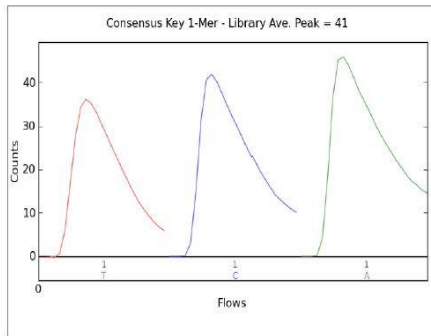
La heat map représente la densité de chargement des puits de la puce par les IS



Le nombre de séquences total le pourcentage de chargement la puce en ISP % enrichissement = librairie avec ISP/ (puits avec ISP-test fragment avec ISP) le pourcentage des polyclonaux la librairie fina



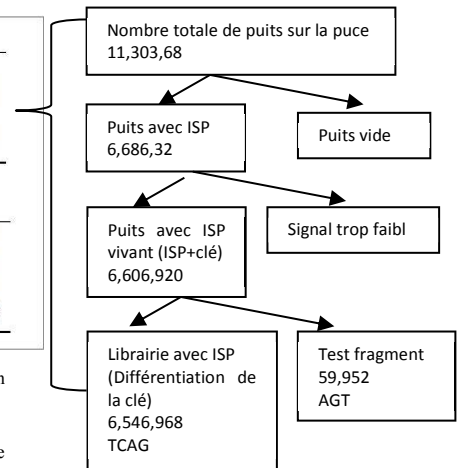
Histogramme des longueur de séquences trimmées (longueur moyenne 179 pb (non affiché sur graphique), médiane séquence 156 pb



Le graphe représente la mesure consensus du signal correspondante de la libération d'un H⁺ après incorporation d'un nucléotide pour les 3 premières bases de la clé intégrée au moment de la préparation de la librairie

Addressable Wells	1,262,519	
With ISPs	696,683	55.2%
Live	654,701	94.0%
Test Fragment	25,287	03.9%
Library	629,414	96.1%
Library ISPs 629,414		
Filtered: Polyclonal	146,056	23.2%
Filtered: Low Quality	65,459	10.4%
Filtered: Primer Dimer	443	00.1%
Final Library ISPs	417,456	66.3%

Séquences considérés comme ayant plus d'un fragment par ISP
Moins de 1% de dimer d'amorces
Nombre de séquences ayant franchi l'ensemble des filtres et reportés dans le fichier FASTQ



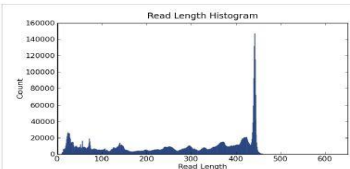
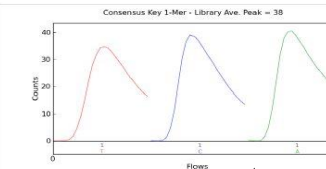
Barcode Name	Sample	Bases	≥ Q20	Reads	Mean Read Length
No barcode	NOSM	1,445,187	1,068,111	9,970	144 bp
IonXpress_001	none	19,199,806	15,367,091	70,389	272 bp
IonXpress_002	none	18,554,950	14,730,515	72,187	257 bp
IonXpress_003	none	25,452,249	20,178,229	97,910	259 bp
IonXpress_004	none	18,227,168	14,302,762	72,683	250 bp
IonXpress_005	none	24,104,479	19,086,449	94,182	255 bp

Annexe 9 : Résumé issu du séquençage HTS pour un run donné.

Library Summary

Based on Predicted Per-Base Quality Scores - Independent of Alignment

Total Number of Bases [Mbp]	1,214.39
• Number of Q20 Bases [Mbp]	966.18
Total Number of Reads	4,465,567
Mean Length [bp]	271
Longest Read [bp]	634

Reference Genome Information
Based on Full Library Alignment to Provided Reference

Nombre de millions de bases filtrées, trimmées et reportées dans le dossier FASTQ.

Nombre de millions de bases filtrées et trimmées au sein des reads ayant une précision supérieure ou égale à 99% (Q20)

Nombre de millions de bases filtrées, trimmées indépendamment de la longueur et reportées dans un fichier FASTQ.

Longueur moyenne des reads de la librairie filtrés, trimmés et reportés dans un fichier FASTQ

Longueur maximum des reads de la librairie filtrés et trimmés.

Histogramme des longueurs de séquences trimmées

Le graphique représente la mesure consensus du signal correspondant à la libération d'un proton H⁺ après incorporation d'un nucléotide pour les 3 premières bases de la clé intégrée au moment de la préparation de la librairie

Nombre total de puits sur la puce
11 303 68

- ↳ Puits avec ISP
6 686 32
- ↳ Puits vide

Puits avec ISP
6 606 920

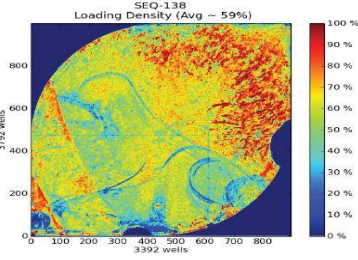
- ↳ Signal trop faible
- ↳ Test fragment ?
59,952
AGT

Librairie avec ISP (Différentiation de la clé)
6 546 968
TCAG

Ion Sphere™ Particle (ISP) Identification Summary

	Count	Percentage
Total Addressable Wells	11,303,686	
↳ Wells with ISPs	6,686,320	59%
↳ Live ISPs	6,606,920	99%
↳ Test Fragment ISPs	59,952	<1%
↳ Library ISPs	6,546,968	99%

	Count	Percentage
Library ISPs / Percent Enrichment	6,546,968	99%
↳ Filtered: Polyclonal	1,117,935	17%
↳ Filtered: Primer dimer	12,907	<1%
↳ Filtered: Low quality	950,559	15%
↳ Final Library Reads	4,465,567	68%



La heat map représente la densité de chargement des puits de la puce par les IS

% enrichissement = librairie avec ISP / (puits avec ISP - test fragment avec ISP)

Séquences considérées comme ayant plus d'un fragment par ISP

Moins de 1% de dimères d'amorces

Nombre de séquences ayant franchi l'ensemble des filtres et reportées dans le fichier

Plugin Summary

Select Plugins To Run Refresh Plugin Status

FastQC — v1.0.1 Completed

↳ FastQC_reports.html

FastqCreator — v3.4.56313 Completed

To download: "Right Click" -> "Save Link As..."

- ↳ [IonXpress_051_R_2013_11_12_12_35_09_user_SEQ-138_Auto_user_SEQ-138_230.fastq](#) 28456K
- ↳ [IonXpress_039_R_2013_11_12_12_35_09_user_SEQ-138_Auto_user_SEQ-138_230.fastq](#) 807K
- ↳ [IonXpress_035_R_2013_11_12_12_35_09_user_SEQ-138_Auto_user_SEQ-138_230.fastq](#) 623K

Résultat de chaque index (séquences des nématodes d'un organe) report

Annexe 10 : Les partenariats du programme Fish-Parasites

- i) L'Equipe BDPEE (Biologie et Diversité des Pathogène Eucaryotes Emergents), INSERM U 1019 – CNRS, UMR 8204) basée à l'Institut Pasteur de Lille (IPL) et appartenant au Centre d'Immunité et d'Infection de Lille (CIIL),
- ii) l'Ifremer de Nantes,
- iii) le Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture de l'Anses à Boulogne sur Mer,
- iv) la Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues, Boulogne sur Mer,
- v) Laboratoire des Sciences et Matériaux pour l'Electronique et d'Automatique UMR6603 de Clermont-Ferrand, vi) ARBOR Technologies de Landévant,
- vi) Anses DER UEA, Unité Méthodologie et études (Direction de l'Evaluation des Risques, Unité d'Etude et Appui en Microbiologie et Santé Animale) de Maison-Alfort,
- vii) Parasitologie-Mycologie, Université Paris Descartes et hôpital Cochin, Paris,
- viii) DSSP Parasitology 'Sapienza' Rome, Italie et
- ix) la société Gènes Diffusion de Douai (prestataire).

Annexe 11 : Prévalence d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova* dans les filets présentée par zone de pêche.

Prévalence d'*Anisakis* dans les filets

zone de pêche	nom commun	effectif	prevalence	ecart-type
27.II.b	saumon	40	0,00	0,00
27.IV.a	eglefin	31	12,90	6,02
27.IV.a	lieu_noir	46	54,35	7,34
27.IV.b	hareng	22	0,00	0,00
27.IV.b	merlan	3	0,00	0,00
27.IV.b	morue	62	3,23	2,24
27.IV.b	sole	4	0,00	0,00
27.IV.c	hareng	7	14,29	13,23
27.IV.c	merlan	10	10,00	9,49
27.IV.c	morue	8	12,50	11,69
27.IV.c	sole	9	0,00	0,00
27.V.b	lingue_bleue	50	94,00	3,36
27.VI.a	lingue_franche	29	48,28	9,28
27.VII.d	anchois	1	0,00	0,00
27.VII.d	bar	7	14,29	13,23
27.VII.d	baudroie	1	0,00	0,00
27.VII.d	eglefin	45	0,00	0,00
27.VII.d	hareng	31	25,81	7,86
27.VII.d	maquereau	23	30,43	9,59
27.VII.d	merlan	69	44,93	5,99
27.VII.d	morue	9	11,11	10,48
27.VII.d	plie	32	0,00	0,00
27.VII.d	sardine	4	0,00	0,00
27.VII.d	sole	63	0,00	0,00
27.VII.g	baudroie	9	66,67	15,71
27.VII.g	eglefin	7	14,29	13,23
27.VII.g	lingue_franche	2	0,00	0,00
27.VII.g	merlu	4	100,00	0,00
27.VII.g	morue	3	66,67	27,22
27.VII.h	baudroie	5	60,00	21,91
27.VII.h	cardine	20	70,00	10,25
27.VII.h	eglefin	4	25,00	21,65
27.VII.h	lieu_noir	1	0,00	0,00
27.VII.h	merlan	1	100,00	0,00
27.VII.h	merlu	6	66,67	19,25
27.VII.h	morue	6	50,00	20,41
27.VII.j	baudroie	17	52,94	12,11
27.VII.j	eglefin	8	25,00	15,31
27.VII.j	merlu	16	87,50	8,27
27.VII.j	morue	1	100,00	0,00
27.VIII.a	anchois	5	20,00	17,89
27.VIII.a	bar	2	0,00	0,00
27.VIII.a	baudroie	14	35,71	12,81
27.VIII.a	eglefin	16	12,50	8,27
27.VIII.a	maquereau	35	31,43	7,85
27.VIII.a	merlan	4	75,00	21,65
27.VIII.a	merlu	28	85,71	6,61
27.VIII.a	morue	1	0,00	0,00
27.VIII.a	sardine	31	0,00	0,00
27.VIII.b	anchois	50	0,00	0,00
27.VIII.b	bar	7	14,29	13,23
27.VIII.b	baudroie	3	0,00	0,00
27.VIII.b	maquereau	29	10,34	5,66
27.VIII.b	merlan	50	48,00	7,07
27.VIII.b	merlu	30	90,00	5,48
27.VIII.b	sardine	31	0,00	0,00
27.VIII.c	anchois	9	0,00	0,00
27.VIII.c	merlu	10	70,00	14,49
27.VIII.d	baudroie	3	66,67	27,22
27.VIII.d	eglefin	6	0,00	0,00
27.VIII.d	merlu	5	80,00	17,89
37.1.2	anchois	81	0,00	0,00
37.1.2	bar	30	0,00	0,00
37.1.2	maquereau	33	0,00	0,00
37.1.2	maquereau_espagnol	31	3,23	3,17
37.1.2	merlu	41	0,00	0,00
37.1.2	sardine	60	0,00	0,00

Prévalence de *Pseudoterranova* dans les filets

zone de pêche	nom commun	effectif	prevalence	ecart-type
27.II.b	saumon	40	0,00	0,00
27.IV.a	eglefin	31	3,23	3,17
27.IV.a	lieu_noir	46	2,17	2,15
27.IV.b	hareng	22	0,00	0,00
27.IV.b	merlan	3	0,00	0,00
27.IV.b	morue	62	3,23	2,24
27.IV.b	sole	4	0,00	0,00
27.IV.c	hareng	7	0,00	0,00
27.IV.c	merlan	10	0,00	0,00
27.IV.c	morue	8	12,50	11,69
27.IV.c	sole	9	0,00	0,00
27.V.b	lingue_bleue	50	74,00	6,20
27.VI.a	lingue_franche	29	0,00	0,00
27.VII.d	anchois	1	0,00	0,00
27.VII.d	bar	7	0,00	0,00
27.VII.d	baudroie	1	0,00	0,00
27.VII.d	eglefin	45	2,22	2,20
27.VII.d	hareng	31	0,00	0,00
27.VII.d	maquereau	23	0,00	0,00
27.VII.d	merlan	67	5,97	2,89
27.VII.d	morue	9	0,00	0,00
27.VII.d	plie	32	0,00	0,00
27.VII.d	sardine	4	0,00	0,00
27.VII.d	sole	63	0,00	0,00
27.VII.g	baudroie	8	25,00	15,31
27.VII.g	eglefin	7	0,00	0,00
27.VII.g	lingue_franche	2	0,00	0,00
27.VII.g	merlu	4	0,00	0,00
27.VII.g	morue	3	66,67	27,22
27.VII.h	baudroie	5	20,00	17,89
27.VII.h	cardine	16	0,00	0,00
27.VII.h	eglefin	3	0,00	0,00
27.VII.h	lieu_noir	1	0,00	0,00
27.VII.h	merlan	1	100,00	0,00
27.VII.h	merlu	5	40,00	21,91
27.VII.h	morue	6	33,33	19,25
27.VII.j	baudroie	15	20,00	10,33
27.VII.j	eglefin	8	0,00	0,00
27.VII.j	merlu	16	37,50	12,10
27.VII.j	morue	1	100,00	0,00
27.VIII.a	anchois	5	0,00	0,00
27.VIII.a	bar	2	0,00	0,00
27.VIII.a	baudroie	14	0,00	0,00
27.VIII.a	eglefin	16	0,00	0,00
27.VIII.a	maquereau	35	0,00	0,00
27.VIII.a	merlan	4	0,00	0,00
27.VIII.a	merlu	25	12,00	6,50
27.VIII.a	morue	1	0,00	0,00
27.VIII.a	sardine	31	0,00	0,00
27.VIII.b	anchois	50	0,00	0,00
27.VIII.b	bar	7	0,00	0,00
27.VIII.b	baudroie	3	0,00	0,00
27.VIII.b	maquereau	29	0,00	0,00
27.VIII.b	merlan	50	0,00	0,00
27.VIII.b	merlu	28	17,86	7,24
27.VIII.b	sardine	31	0,00	0,00
27.VIII.c	anchois	9	0,00	0,00
27.VIII.c	merlu	9	11,11	10,48
27.VIII.d	baudroie	3	0,00	0,00
27.VIII.d	eglefin	6	0,00	0,00
27.VIII.d	merlu	5	40,00	21,91
37.1.2	anchois	81	0,00	0,00
37.1.2	bar	30	0,00	0,00
37.1.2	maquereau	33	0,00	0,00
37.1.2	maquereau_espagnol	31	0,00	0,00
37.1.2	merlu	41	0,00	0,00
37.1.2	sardine	60	0,00	0,00

Annexe 12 : Calcul de l'intensité effectuée par l'Anses DER UEA, Unité Méthodologie et études (Direction de l'Evaluation des Risques, Unité d'Etude et Appui en Microbiologie et Santé Animale) de Maisons-Alfort

Le nombre de parasites est calculé pour un poisson et un organe donné pour les 2 méthodes d'analyses utilisées : analyse individuelle et analyse haut débit.

Différents cas de figure sont alors possible :

- **Pour un poisson et un organe donné, pour lequel seule une analyse individuelle a été réalisée** : le nombre de parasites pour chaque genre est alors calculé de la façon suivante :

$$Nbparas_i = \%_i \times Tot_i$$

Tot_i : nombre de parasites estimés en macro, %_i : pourcentage de parasites du genre i estimé par PCR individuelle, Nbparas_i : nombre de parasites du genre

- **Pour un poisson et un organe donné, pour lequel seule une analyse haut débit a été réalisée** : pour calculer le nombre de parasites de chaque genre le nombre de copies de mitochondries est nécessaire. Ce nombre a été déterminé pour 3 genres (Anisakis, Pseudoterranova et Contraeaecum) selon 2 méthodes. Afin d'utiliser ces valeurs les choix suivants ont été effectués :
 - Concernant Anisakis, Pseudoterranova et Contraeaecum, la moyenne du nombre de copies de mitochondries estimées par les deux méthodes a été calculée. On a ainsi pour Anisakis un nombre de copies de mitochondries de $7,665.10^6$, pour Contraeaecum $2,625.10^7$ et pour Pseudoterranova $3,325.10^7$.
 - Concernant Hysterothylacium, Phocascaris et ND, le nombre de parasites a été estimé en utilisant comme nombre de copies de mitochondries la moyenne de ceux déterminés pour les 3 genres précédents. On a alors un nombre de mitochondries de $2,239.10^7$.

Le nombre de parasites par organe et poisson pour chaque genre est alors calculé de la façon suivante :

- Dans un premier temps, le nombre de reads attribuables à chaque genre présent est calculé.

$$Nread_i = \frac{\%_i \times reads_totaux}{nb_copies_mitochondries_i}$$

Nreads_i : nombre de reads attribuables au genre i , %_i : pourcentage de read attribuable au parasite du genre i , reads_totaux : nombre de reads totaux de l'analyse haut débit , Nb_copies_mitochondries_i : nombre de copies de mitochondries du genre i

Ce calcul est effectué pour tous les genres présents dans un poisson et un organe. On émet l'hypothèse que le nombre de read peut être relié au nombre de parasites observé (**pour un organe, un poisson**) à un facteur multiplicatif près, appelé k.

- Ce facteur k est calculé de la façon suivante, pour un poisson (v)un organe (u):

$$k_{v,u} = \frac{Total_parasites_exact}{\sum_{i=1}^j Nreads1 + Nreads2 + \dots + Nreadsj}$$

Total_parasites_exact : nombre de parasites estimés en macro

- Le nombre de parasites pour chaque genre, pour un poisson, un organe (une analyse haut débit) est finalement évalué de la façon suivante :

$$N_i = Nbparas_i \times k_{u,v}$$

- **Pour un poisson et un organe donné, pour lequel les analyses haut débit et individuelle ont été réalisées** : on ajoute alors les résultats issus des 2 cas de figure précédents.
- **Pour un poisson et un organe donné, pour lequel une des deux analyses haut débit ou individuelle est manquante (non réalisée ou analyse défectueuse), le résultat quantitatif est considéré comme une donnée manquante.**

On a alors 553 lignes poisson/organe sur les 15912 que compte la base pour lesquels le nombre de parasites n'entre pas dans le calcul du niveau de contamination

I. Modèle logistique multivarié

Un modèle logistique multivarié peut être décrit de la façon suivante :

Soit P_{ijk} la prévalence pour l'espèce de poisson i , la zone de pêche j , la taille de poisson k ; la prévalence est exprimée au travers du modèle suivant :

$$\text{Logit}(P_{ijk}) = \text{const} + a \text{ espèce } i + b \text{ taille de poisson } k + \text{erreur aléatoire}$$

Avec

- $\text{logit}(P_{ijk}) = \log(P / (1 - P))$
- const est la constante générale (ordonnée à l'origine ou intercept) ;
- Les paramètres a, b sont des paramètres de pente du modèle

Le modèle final pour expliquer la prévalence en *Anisakis* et *Pseudoterranova* dans le filet a pour variables explicatives l'espèce de poisson et la taille de celui-ci. Les paramètres de pente de ce modèle (a, b, g, \dots) sont décrits sous leur forme exponentielle : ($\exp(a), \exp(b), \exp(c)$) dénommée Odds-Ratio ($OR(a), OR(b), OR(c)$).

Prédiction de la prévalence

L'AIC du modèle avec l'effet aléatoire étant plus élevé que celui sans effet aléatoire, le modèle sans effet aléatoire a été utilisé afin de faire les prédictions, après vérification de la qualité de l'ajustement. Les coefficients du modèle étant estimés, la prévalence peut être prédite grâce à la formule suivante (modèle sans effet aléatoire):

$$\text{EMBED Equation.3} \quad P_{ijk} = \frac{\exp(\text{const} + a \text{ espèce } i + b \text{ taille } k)}{1 + \exp(\text{const} + a \text{ espèce } i + b \text{ taille } k)}$$

Résultats de l'analyse univariée

Tableau I: Résultats des modèles logistiques univariés réalisés sur toutes les données

Variable	Modalités	Pente	Ecart type	P significativité	P Test LRT	AIC
nc_poisson référence : Anchois	lingue bleue	7,97	1,17	7,69*10-12	<2,2*10-16	1235,1
	baudroie	5,44	1,02	1,07*10-07		
	merlu	5,38	1,02	1,25*10-07		
	lieu noir	5,38	1,03	1,77*10-07		
	cardine	5,82	1,12	1,79*10-07		
	lingue franche	4,68	1,05	7,77*10-06		
	merlan	4,53	1,02	8,38*10-06		
	maquereau	3,43	1,03	8,98*10-04		
	morue	3,28	1,03	1,49*10-03		
	hareng	2,97	1,04	4,39*10-03		
	eglefin	2,81	1,05	7,42*10-03		
	maquereau espagnol	1,58	1,43	2,70*10-01		
	bar	1,03	1,23	4,05*10-01		
	sardine	-13,59	581,08	0,98		
	sole	-13,59	633,54	0,98		
saumon	-13,59	1031,32	0,99			
plie	-13,59	1153,05	0,99			
Famille_poisson référence : Gadidae	Lotidae	1,88	0,24	1,52*10-15	<2,2*10-16	1366,8
	Merlucciidae	1,31	0,20	5,22*10-11		
	Clupeidae	-1,90	0,29	8,72*10-11		
	Lophiidae	1,36	0,22	9,76*10-10		
	Moronidae	-3,05	0,72	2,31*10-05		
	Engraulidae	-4,08	1,01	5,29*10-05		
	Scophthalmidae	1,75	0,50	4,47*10-04		
	Scombridae	-0,87	0,25	5,46*10-04		
	Soleidae	-17,67	633,53	0,98		
	Salmonidae	-17,67	1031,32	0,99		
Pleuronectidae	-17,67	1153,05	0,99			
Taille		1,12	0,08	<2*10-16	<2,2*10-16	1598,5
Zone de pêche référence: 37.1	27.V	8,37	1,17	6,95*10-13	<2,2*10-16	1251,6
	27.VI	5,81	1,04	2,31*10-08		
	27.VIII	4,81	1,01	1,82*10-06		
	27.VII	4,75	1,01	2,43*10-06		
	27.IV	4,12	1,02	5,16*10-05		
	27.II	-10,95	379,40	0,98		
Sous zone de pêche référence : 37.1.2	27.V.b	8,37	1,17	6,95*10-13	<2,2*10-16	1123,4
	27.VII.h	6,14	1,05	5,04*10-09		
	27.VII.j	6,10	1,05	6,39*10-09		
	27.VII.fg	6,02	1,08	2,59*10-08		
	27.VI.a	5,55	1,07	2,08*10-07		
	27.IV.a	5,17	1,03	5,07*10-07		
	27.VIII.a	4,95	1,02	1,19*10-06		
	27.VIII.d	5,33	1,14	2,84*10-06		
	27.VIII.b	4,65	1,01	4,60*10-06		
	27.VIII.c	5,08	1,11	4,68*10-06		
	27.VII.d	4,05	1,01	6,64*10-05		
	27.IV.c	3,28	1,17	5,04*10-03		
	27.IV.b	2,54	1,13	2,41*10-02		
27.II.b	-10,95	379,40	0,98			
Maigre/gras référence : maigre	Gras	-1,93	0,19	<2*10-16	<2,2*10-16	1629,5
	Semi-gras	-3,94	0,58	1,56*10-11		
Poids		0,77	0,07	<2*10-16	<2,2*10-16	1745
Saison référence : été	Automne	1,04	0,15	1,23*10-11	7,96*10-12	1862,9
	Hiver	0,39	0,18	2,87*10-02		
	Printemps	0,20	0,16	0,22		
Sexe référence : 1	2	0,14	0,13	0,27	0,2747	1544,2

Colinéarité entre les variables explicatives en analyse univariée

La colinéarité entre les différentes variables explicatives a été testée. Pour cela dans le cas de la colinéarité entre 2 variables qualitatives, le test du χ^2 a été utilisé, dans le cas de la colinéarité entre une variable qualitative et quantitative une ANOVA a été effectuée et dans celui de deux variables quantitatives c'est une régression linéaire. Les différentes valeurs du p de significativité ont été reportées dans les tableaux suivants : tableau II

La grande majorité des variables explicatives sont colinéaires au seuil de significativité de 5 %. Si on considère l'ensemble des données, seul le sexe n'est pas colinéaire à la taille, au poids et à la variable maigre/gras.

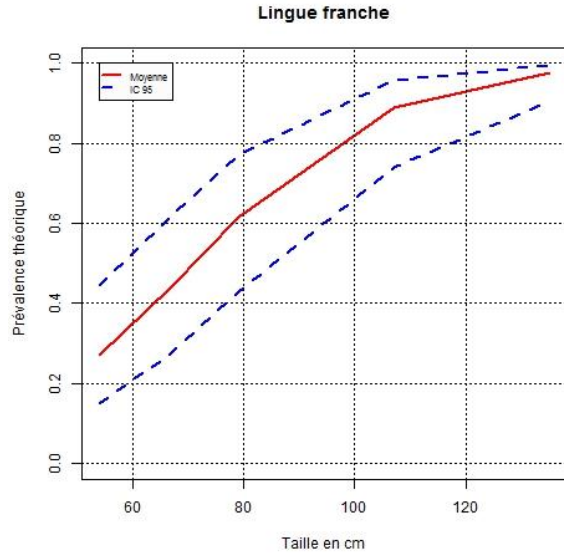
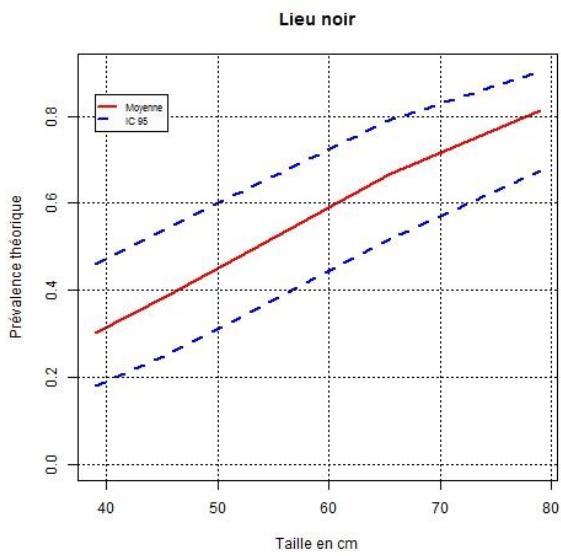
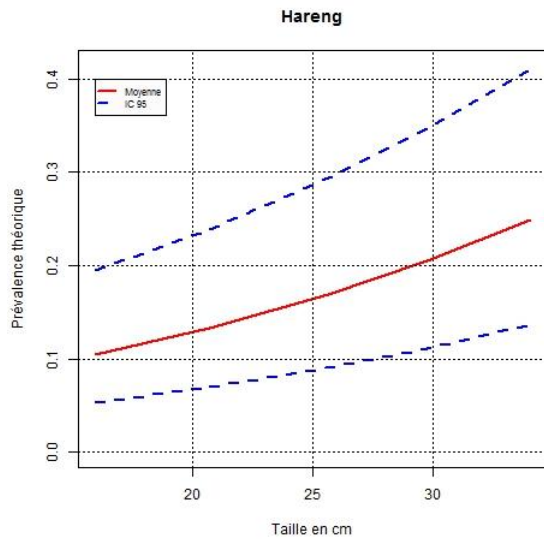
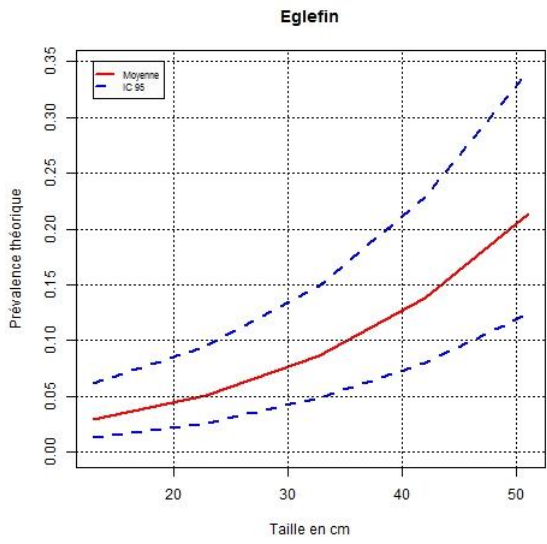
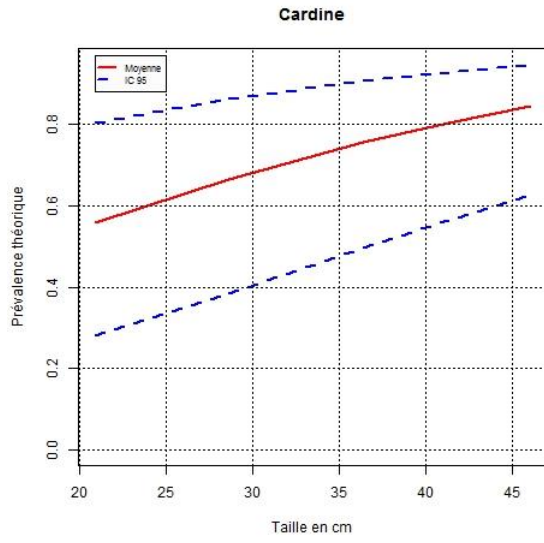
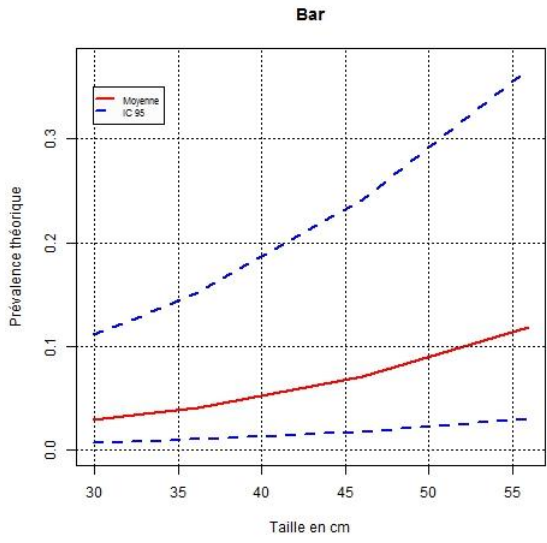
Tableau II: Résultats de la colinéarité entre les différentes variables explicatives sur toutes les données

	nc_poisson	zone pêche	sous zone pêche	taille	poids	maigre/gras	saison	sexe	famille
nc_poisson	1								
zone pêche	5,00*10-04	1							
sous zone pêche	5,00*10-04	5,00*10-04	1						
taille	<2,2*10-16	<2,2*10-16	<2,2*10-16	1					
poids	<2,2*10-16	<2,2*10-16	<2,2*10-16	<2*10-16	1				
maigre/gras	5,00*10-04	<2,2*10-16	5,00*10-04	<2,2*10-16	<2,2*10-16	1			
saison	5,00*10-04	<2,2*10-16	5,00*10-04	8,04*10-08	4,99*10-09	<2,2*10-16	1		
sexe	5,00*10-04	8,89*10-07	5,00*10-04	0,93	0,49	0,73	6,08*10-07	1	
famille	5,00*10-04	5,00*10-04	5,00*10-04	<2,2*10-16	<2,2*10-16	5,00*10-04	5,00*10-04	2,50*10-03	1

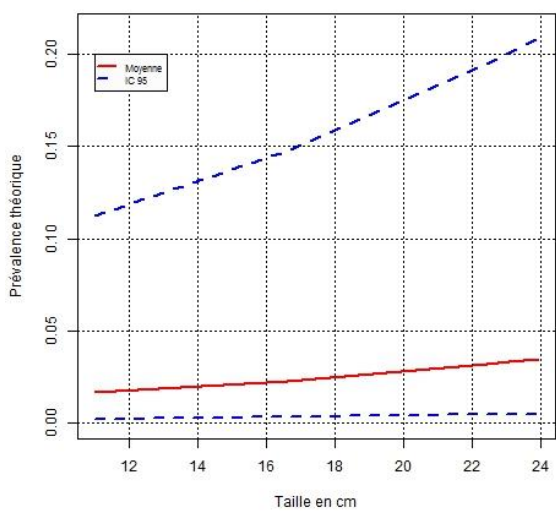
II. Prédictions de prévalence

A partir du modèle logistique multivarié, il a été possible de faire des prédictions de la prévalence pour les différents genres de poisson et pour différentes tailles. Les valeurs de taille ont été fixées pour chaque espèce en tenant compte du minimum, de la moyenne et du maximum de la taille présente dans la base de données par espèce.

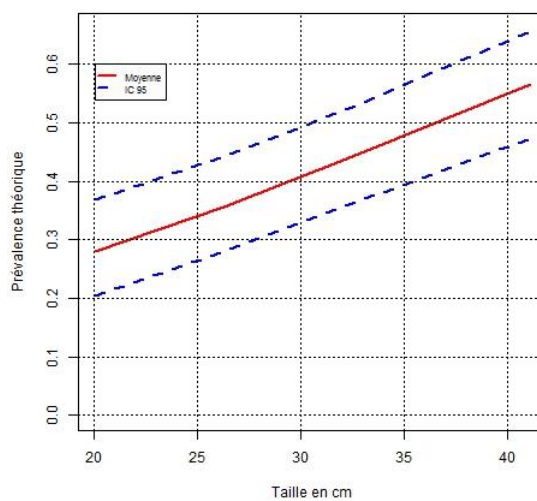
La prévalence théorique issue des prédictions a été représentée graphiquement en fonction de la taille du poisson pour chaque espèce de poisson.



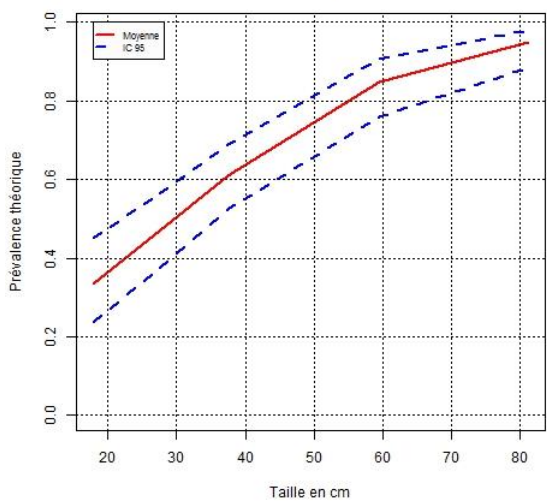
Maquereau espagnol



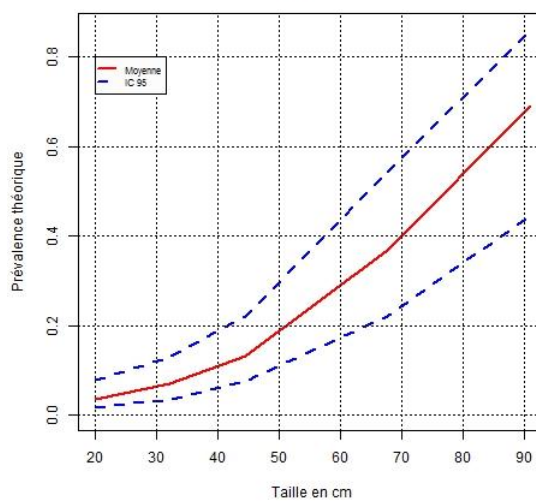
Merlan



Merlu



Morue



Annexe 14 : Modèle logistique pour la prédiction de la présence de larves d'*Anisakis* dans les filets en fonction de l'intensité de larves d'*Anisakis* dans la cavité corporelle.

Le modèle logistique s'écrit sous la forme

`glm(formula = fish$Anisakis_FI ~ log10(CC), family = binomial(link = logit),`

AIC : 1349.2

Le meilleur modèle minimiserait le taux de faux positifs (1-spécificité) (False positive rate) et maximiserait le taux de vrais positifs (sensibilité) (true positive rate). La spécificité et la sensibilité est fonction du niveau d'infestation dans la cavité corporelle choisi pour écarter le filet correspondant.

Un filet contaminé : M+

Un filet non contaminé M-

Un filet écarté sur la base de l'examen de la cavité corporelle T+

Un filet gardé pour la consommation sur la base de l'examen de la cavité corporelle T-

Rappel

La sensibilité $P(T+/M+)$: important pour les consommateurs doit se rapprocher de 1

La spécificité $1-P(T-/M-)$: important pour les producteurs doit se rapprocher de 1

Résumé

Les genres *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* et *Contracaecum*, membres de la famille des Anisakidae, sont des nématodes dont les larves sont présentes chez de nombreuses espèces de poissons et céphalopodes. Ces larves peuvent induire des pathologies digestives et/ou allergiques chez l'Homme. En France, les données de prévalence sur les espèces de poissons les plus consommées étaient jusqu'alors peu disponibles. Ce travail de thèse s'intègre dans le programme ANR *Fish-Parasites*, financé par l'ANR (ANR-10-ALIA-004) qui avait pour but d'évaluer le risque dû à ce parasite. Pour ce faire, un outil d'identification par séquençage *Sanger* a été utilisé pour identifier les Anisakidae présents en petit nombre dans les tissus ou organes et la technologie de séquençage à haut-débit (*HTS*) a été mise au point afin d'identifier les Anisakidae présents en grand nombre. Sur 1 768 poissons échantillonnés dans l'océan Atlantique Nord Est et la mer Méditerranée, deux espèces étaient exemptes de parasites : la plie (*Pleuronectes platessa*) et le saumon Atlantique (*Salmo salar*) d'élevage. La majorité (42.9 %) des poissons n'était pas infectée par des Anisakidae. En revanche, 28,6 % étaient infectés au niveau des viscères ; 23 % l'étaient dans les viscères et les filets et 5,5 % étaient infectés par les Anisakidae uniquement dans les filets. Les cinq espèces de poisson dont la prévalence dans les filets était la plus élevée étaient : la lingue bleue (*Molva dypterygia*, 100 %), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*, 70 %), le lieu noir (*Pollachius virens*, 63 %), la baudroie (*Lophius piscatorius*, 61 %) et le merlu (*Merluccius merluccius*, 60 %). *Anisakis simplex* était présent dans toutes les zones de pêches sauf dans le golfe du Lion. L'étude statistique logistique multivariée a montré que la variable espèce et la variable taille du poisson influençaient la prévalence d'*Anisakis* et de *Pseudoterranova* dans les filets. Le *HTS* effectué sur la plateforme PGM™ Ion Torrent s'est révélé être un outil puissant et innovant permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons d'Anisakidae à moindre coût, en peu de temps. et avec un résultat équivalent à la méthode individuelle par séquençage *Sanger*.

Abstract

Anisakis, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* and *Contracaecum* genera, members of the Anisakid family, are nematodes that exist as larvae in numerous fish and cephalopods species. These larvae may induce digestive and/or allergic pathologies in human being. In France, data on the Anisakid prevalence in the most-consumed fish species are scarce so far. This work is part of the ANR Fish-Parasites program, funded by the ANR (ANR-10-ALIA-004) which aimed at assessing the risk due to these parasites. To achieve this work, a Sanger sequencing tool was used to identify Anisakidae present in small numbers in fish tissues or organs; the high throughput sequencing (HTS) technology was developed to identify the large numbers of Anisakidae. From the 1 768 fish sampled from North East Atlantic Ocean and the Mediteranean sea, two species were free of parasites: the plaice (*Pleuronectes platessa*) and the farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). The majority of fish (42.9 %) was not infected by Anisakids. On the contrary, 28.6% were contaminated in the visceral organs; 23% in both visceral organs and fillets and, finally, 5.5% of the fish were infected by Anisakids only in the fillets. The five fish species with the highest prevalence in their fillets were: the blue ling (*Molva dypterygia*, 100 %), the megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*, 70 %), the saithe (*Pollachius virens*, 63 %), the monkfish (*Lophius piscatorius*, 61 %) and the hake (*Merluccius merluccius*, 60 %). *Anisakis simplex* was isolated from all the fishing areas except for the Lion Gulf. The multivariate logistic statistical study showed that the fish species and size affect the prevalence of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in the fillets. The HTS using the PGM™ Ion Torrent platform proved to be a powerful and innovative tool for the analysis of large numbers of Anisakids samples at low cost, in a shorter time and with results equivalent to the individual Sanger method of sequencing.